

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 10780-1:2017

ISO 6579-1:2017

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG CHUỖI THỰC PHẨM -
PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN, ĐỊNH LƯỢNG VÀ
XÁC ĐỊNH TYP HUYẾT THANH CỦA SALMONELLA -
PHẦN 1: PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN SALMONELLA SPP.**

Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1: Detection of Salmonella spp.

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 10780-1:2017 thay thế TCVN 4829:2005 (ISO 6579:2002, Cor. 1:2004), Sửa đổi 1:2008 TCVN 4829:2005 (ISO 6579:2002, Amd. 1:2007) và TCVN 6402:2007 (ISO 6785:2001);

TCVN 10780-1:2017 hoàn toàn tương đương với ISO 6579-1:2017;

TCVN 10780-1:2017 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;

Bộ TCVN 10780 (ISO 6579), *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp phát hiện, định lượng và xác định typ huyết thanh của Salmonella* gồm các phần sau đây:

- TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017), *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp phát hiện, định lượng và xác định typ huyết thanh của Salmonella – Phần 1: Phát hiện Salmonella spp.*;
- TCVN 10780-2:2015 (ISO/TS 6579-2:2012), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện, định lượng và xác định kiểu huyết thanh của Salmonella – Phần 2: Định lượng bằng kỹ thuật số đếm có xác suất lớn nhất được thu nhỏ*;
- TCVN 10780-3:2016 (ISO/TR 6579-3:2014), *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp phát hiện, định lượng và xác định typ huyết thanh của Salmonella – Phần 3: Hướng dẫn xác định typ huyết thanh của Salmonella spp.*

Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp phát hiện, định lượng và xác định typ huyết thanh của *Salmonella* – Phần 1: Phát hiện *Salmonella* spp.

*Microbiology of the food chain – Horizontal method
for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella –
Part 1: Detection of Salmonella spp.*

CẢNH BÁO – Để đảm bảo an toàn cho nhân viên phòng thử nghiệm, các phép thử phát hiện *Salmonella* 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 xử lý các nguyên vật liệu sau ủ. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải thành thạo với các thao tác thực hành phòng thử nghiệm thông thường. Tiêu chuẩn này không đề cập đến các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng tiêu chuẩn này. Người sử dụng tiêu chuẩn phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và đảm bảo tuân thủ các quy định hiện hành của quốc gia.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện *Salmonella*. Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho:

- các sản phẩm thực phẩm dùng cho người và thức ăn chăn nuôi;
- các mẫu môi trường trong khu vực sản xuất và xử lý thực phẩm.
- các mẫu từ giai đoạn sản xuất ban đầu, như phân động vật, bụi, bông gạc.

Bằng phương pháp này, hầu hết đều phát hiện được các *Salmonella* serovar cần tìm. Để xác định một số serovar cụ thể, có thể cần bổ sung các bước nuôi cấy. Đối với *Salmonella* Typhi và *Salmonella* Paratyphi sử dụng quy trình quy định trong Phụ lục D.

Môi trường tăng sinh chọn lọc thạch Rappaport-Vassiliadis (MSRV) nửa đặc cải biến để phát hiện các chủng *Salmonella* di động và không thích hợp để phát hiện các chủng *Salmonella* không di động.

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 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 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*

TCVN 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần), *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*

TCVN 8128:2015 (ISO 11133:2014), *Vi sinh vật trong thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và nước – Chuẩn bị, sản xuất, bảo quản và thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy.*

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 các đặc điểm về sinh hoá và huyết thanh được mô tả khi tiến hành các thử nghiệm theo tiêu chuẩn này.

3.2

Phát hiện Salmonella (*detection of Salmonella*)

Việc xác định *Salmonella* (3.1), trong một khối lượng hoặc thể tích cụ thể của sản phẩm hoặc diện tích bề mặt hoặc vật thể (ví dụ: các túi bọc ủng), khi tiến hành các thử nghiệm theo tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Yêu cầu chung

Việc phát hiện *Salmonella* cần qua bốn giai đoạn kế tiếp nhau như trong 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 vi khuẩn khác. Do đó, cần tăng sinh sơ bộ để đảm bảo phát hiện một lượng nhỏ *Salmonella* hoặc *Salmonella* bị tổn thương thực thể.

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

Cấy phần mẫu thử trong nước đệm pepton ở nhiệt độ phòng, sau đó ủ ở nhiệt độ từ 34 °C đến 38 °C trong 18 h.

Đối với các lượng mẫu thử lớn (ví dụ: 1 lít hoặc nhiều hơn), nên làm nóng nước đệm pepton ở nhiệt độ từ 34 °C đến 38 °C trước khi trộn với phần mẫu thử.

4.3 Tăng sinh trong/trên môi trường chọn lọc

Cấy dịch tăng sinh thu được trong 4.2 vào môi trường Rappaport-Vassiliadis có đậu tương (canh thang RVS) hoặc thạch Rappaport-Vassiliadis nửa đặc cải biến và canh thang Muller-Kauffmann tetrathionat/novobioxin (canh thang MKTTn).

Canh thang RVS hoặc thạch MSR/V được ủ ở 41,5 °C trong 24 h và canh thang MKTTn được ủ ở 37 °C trong 24 h.

Đối với một số sản phẩm có thể cần ủ môi trường tăng sinh chọn lọc thêm 24 h.

CHÚ THÍCH: Thạch MSR/V dùng để phát hiện các chủng *Salmonella* di động và không thích hợp cho việc phát hiện các chủng *Salmonella* không di động.

4.4 Nuôi cấy trên môi trường đặc chọn lọc

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

- thạch xylose lysin deoxycholate (thạch XLD).
- môi trường đặc chọn lọc bất kỳ khác bổ sung cho thạch XLD (ví dụ xem Phụ lục E).

Thạch XLD được ủ ở 37 °C và được kiểm tra sau 24 h. Môi trường thạch chọn lọc thứ hai được ủ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.5 Kháng định

Các khuẩn lạc *Salmonella* giả định được cấy truyền và được kháng định để nhận dạng chúng bằng các phép thử sinh hoá và huyết thanh thích hợp.

5 Môi trường cấy, thuốc thử và kháng huyết thanh

Đối với thực hành phòng thử nghiệm, xem TCVN 6404 (ISO 7218) và TCVN 8128 (ISO 11133).

Thành phần và việc chuẩn bị thuốc thử và môi trường nuôi cấy được quy định trong Phụ lục B.

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.

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

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

Xem quy định trong TCVN 6404 (ISO 7218).

6.2 Tủ sấy, có thể vận hành ở nhiệt độ từ 25 °C đến 50 °C.

6.3 Tủ ẩm, có thể vận hành ở nhiệt độ từ 34 °C đến 38 °C và 37 °C ± 1 °C.

6.4 Tủ ẩm, có thể vận hành ở nhiệt độ 41,5 °C ± 1 °C hoặc nồi cách thủy có thể vận hành ở nhiệt độ 41,5 °C ± 1 °C.

6.5 Nồi cách thủy, có thể vận hành ở nhiệt độ từ 47 °C đến 50 °C.

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

6.7 Nồi cách thủy, có thể vận hành ở nhiệt độ ở 45 °C ± 1 °C.

Nên sử dụng nồi cách thủy (từ 6.4 đến 6.7) có chứa chất kháng khuẩn vì liệu lây nhiễm *Salmonella* thấp.

6.8 Tủ lạnh, có thể vận hành ở nhiệt độ 5 °C ± 3 °C.

6.9 Tủ đông lạnh, có thể vận hành ở nhiệt độ -20 °C ± 5 °C.

6.10 Que cấy vòng vô trùng, có đường kính khoảng 3 mm (dung tích 10 µl), dung tích 1 µl và kim cấy hoặc que cấy.

6.11 Dụng cụ đo pH, có độ chính xác ± 0,1 đơn vị pH ở 20 °C đến 25 °C.

6.12 Ống, chai hoặc bình vô trùng, có nắp đậy với dung tích thích hợp.

6.13 Pipet chia độ hoặc pipet tự động vô trùng, có dung tích danh định 25 ml, 10 ml và 1 ml và 0,1 ml.

6.14 Đĩa Petri vô trùng, đường kính khoảng 90 mm và cỡ lớn (đường kính 140 mm) (tùy chọn).

7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này (xem tiêu chuẩn cụ thể về lấy mẫu liên quan đến sản phẩm tương ứng). Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể thì các bên có liên quan tự thỏa thuận về vấn đề này.

Nên lấy mẫu theo phương pháp nêu trong TCVN 11923 (ISO/TS 17728)^[26] đối với thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, trong TCVN 6400 (ISO 707)^[27] đối với sữa và sản phẩm sữa, trong TCVN 10782 (ISO 13307)^[28] đối với giai đoạn sản xuất ban đầu, trong TCVN 7925 (ISO 17604)^[29] đối với lấy mẫu thân thịt và trong TCVN 8129 (ISO 18593)^[25] đối với lấy mẫu bề mặt.

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

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử từ mẫu phòng thử nghiệm theo tiêu chuẩn cụ thể phù hợp với các sản phẩm tương ứng. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể 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

Để chuẩn bị huyền phù ban đầu, trong trường hợp chung, sử dụng môi trường tăng sinh sơ bộ được quy định trong B.2 (nước đệm pepton) làm dịch pha loãng. Làm ấm trước nước đệm peptone (BPW) đến nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

Nhìn chung, bổ sung một lượng phần mẫu thử (khối lượng hoặc thể tích) vào một lượng BPW (khối lượng hoặc thể tích) để thu được độ pha loãng mười lần. Để thực hiện điều này, trộn 25 g phần mẫu thử với 225 ml BPW. Tuy nhiên, đối với một số loại mẫu (ví dụ: túi bọc ủng, bụi), có thể sử dụng tỷ lệ khác.

Đối với các sản phẩm cụ thể, xem các quy trình quy định trong TCVN 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần).

Tiêu chuẩn này đã được đánh giá xác nhận trên phần mẫu thử 25 g. Có thể sử dụng phần mẫu thử nhỏ hơn mà không cần phải đánh giá/kiểm tra xác nhận bổ sung với điều kiện vẫn duy trì cùng một tỷ lệ giữa phần mẫu thử với canh thang tăng sinh (tăng sinh sơ bộ). Có thể sử dụng phần mẫu thử lớn hơn phần mẫu thử đã được đánh giá xác nhận ban đầu nếu việc đánh giá/kiểm tra xác nhận cho thấy không ảnh hưởng xấu đến việc phát hiện *Salmonella* spp.

CHÚ THÍCH 1: Việc đánh giá xác nhận có thể thực hiện theo các phản tương ứng của ISO 16140. Việc kiểm tra xác nhận các mẫu gộp có thể thực hiện theo Phụ lục D của ISO 6887-1:2017^[30].

Đối với các lượng lớn (ví dụ: 1 lít hoặc nhiều hơn), nên làm ấm trước nước đệm pepton ở nhiệt độ từ 34 °C đến 38 °C trước khi trộn với phần mẫu thử.

CHÚ THÍCH 2: Khi cần kiểm tra nhiều hơn một phần mẫu thử 25 g từ lô sản phẩm thực phẩm xác định và khi có bằng chứng cho thấy việc gộp các phần mẫu thử không ảnh hưởng đến kết quả của thực phẩm cụ thể đó, có thể gộp các phần mẫu thử. Thông tin thêm về gộp các mẫu cũng như quy trình kiểm tra ảnh hưởng của việc gộp lên độ nhạy của phương pháp xem ISO 6887-1:2017^[38].

9.2 Tăng sinh sơ bộ không chọn lọc

Ủ huyền phù ban đầu (9.1) ở nhiệt độ từ 34 °C đến 38 °C (6.3) trong 18 h ± 2 h.

Cho phép bảo quản Mẫu tăng sinh sơ bộ sau khi ủ có thể bảo quản ở 5 °C (6.8) tối đa 72 h (xem Tài liệu tham khảo từ [30] đến [34]).

9.3 Tăng sinh chọn lọc

9.3.1 Yêu cầu chung

Để môi trường tăng sinh chọn lọc, canh thang RVS hoặc thạch MSR/V (B.3 hoặc B.4) và canh thang MKTTn (B.5) cân bằng đến nhiệt độ phòng nếu trước đó được bảo quản ở nhiệt độ thấp hơn.

Giảm thiểu việc chuyển các vật liệu dạng hạt từ môi trường tăng sinh sơ bộ sang môi trường tăng sinh chọn lọc.

Sau khi ủ, cho phép bảo quản môi trường tăng sinh sơ bộ ở 5 °C trong tủ lạnh (6.8) tối đa 72 h (xem Tài liệu tham khảo từ [30] đến [34]).

CHÚ THÍCH: Thạch MSR/V dùng để phát hiện các chủng *Salmonella* di động và không thích hợp để phát hiện các chủng *Salmonella* không di động.

9.3.2 Quy trình đối với các mẫu thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và các mẫu môi trường từ khu vực chế biến thực phẩm

Chuyển 0,1 ml dịch cấy tăng sinh thu được trong 9.2 vào ống chứa 10 ml canh thang RSV (B.3) hoặc sang bề mặt đĩa thạch MSR/V (B.4). Cấy từ một đến ba điểm cách đều nhau trên bề mặt môi trường thạch MSR/V.

Chuyển 1 ml dịch cấy thu được trong 9.2 vào ống có chứa 10 ml canh thang MKTTn (B.5).

Ủ canh thang RVS đã cấy ở 41,5 °C (6.4) trong 24 h ± 3 h.

Ủ các đĩa thạch MSR/V đã cấy ở 41,5 °C (6.4) trong 24 h ± 3 h. **Không lật úp các đĩa.**

Ủ canh thang MKTTn đã cấy ở 37 °C (6.3) trong 24 h ± 3 h.

Các khuẩn lạc trên đĩa MSR/V nghi ngờ sẽ cho thấy màu xám-trắng, quang đục lan rộng xung quanh giọt cấy.

Trong các sản phẩm sữa bột và phomat, *Salmonella* có thể bị tổn thương đến chết. Ủ tiếp môi trường tăng sinh chọn lọc từ các sản phẩm này thêm 24 h ± 3 h (xem Tài liệu tham khảo [35]).

Đối với một số sản phẩm khác, ví dụ: khi nghiên cứu các mẫu gây ngộ độc, việc ủ thêm này hết sức cần thiết.

9.3.3 Quy trình đối với mẫu từ giai đoạn sản xuất ban đầu

Cấy 0,1 ml dịch cấy tăng sinh sơ bộ (9.2) thành một đến ba điểm cách đều nhau trên bề mặt môi trường vào thạch MSR/V (B.4).

Ủ các đĩa MSR/V đã cấy ở 41,5 °C (6.4) trong 24 h ± 3 h.

Không lật úp các đĩa thạch.

Các khuẩn lạc trên đĩa MSR/V nghi ngờ sẽ cho thấy màu xám-trắng, quang đục lan rộng từ giọt được cấy.

Nếu các đĩa này âm tính sau 24 h thì ủ tiếp 24 h ± 3 h.

CHÚ THÍCH: Có thể tăng độ nhạy bằng cách sử dụng quy trình tăng sinh chọn lọc thứ hai, ví dụ: canh thang MKTTn được ủ ở 41,5 °C trong 24 h ^[36].

9.4 Nuôi cấy trên môi trường thạch chọn lọc

9.4.1 Yêu cầu chung

Từ dịch cấy tăng sinh chọn lọc (9.3), cấy vào hai môi trường thạch phân lập chọn lọc. Môi trường phân lập thứ nhất là thạch Xylose Lysine Deoxycholat (XLD). Môi trường phân lập thứ hai do phòng thử nghiệm tự chọn.

Việc chọn môi trường đĩa thạch chọn lọc thứ hai bổ sung cho thạch XLD và dựa vào các đặc tính chẩn đoán không giống với thạch XLD tạo thuận tiện cho việc phát hiện, ví dụ *Salmonella* dương tính lactose hoặc âm tính H₂S. Các ví dụ về môi trường phân lập, xem Phụ lục E.

Để các đĩa thạch XLD (B.6) và môi trường đĩa thạch chọn lọc thứ hai cân bằng đến nhiệt độ phòng nếu trước đó được bảo quản ở nhiệt độ thấp hơn. Nếu cần, làm khô bề mặt các đĩa thạch trước khi sử dụng [xem TCVN 8128 (ISO 11133)].

9.4.2 Quy trình đối với các mẫu thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và mẫu môi trường từ khu vực chế biến thực phẩm

Từ dịch cấy thu được trong canh thang RVS (9.3.2), cấy một vòng 10 μ l (6.10) lên bề mặt đĩa thạch XLD (B.6) sao cho thu được các khuẩn lạc riêng rẽ. Thực hiện tương tự với môi trường đĩa thạch chọn lọc thứ hai.

Từ các vị trí cho thấy các khuẩn lạc dương tính thu được trên thạch MSR/V (9.3.2), xác định điểm có quang đục rộng nhất và sử dụng que cấy vòng 1 μ l (6.10) nhúng vào mép trong quang đục của các khuẩn lạc dương tính trên thạch MSR/V. Rút que cấy vòng ra sao cho không lấy theo các mảng lớn của thạch MSR/V. Cấy lên bề mặt đĩa thạch XLD (B.6) sao cho thu được các khuẩn lạc riêng rẽ. Thực hiện tương tự với môi trường đĩa thạch chọn lọc thứ hai.

Từ dịch cấy thu được trong canh thang MKTTn (9.3.2), cấy một vòng 10 μ l (6.10) lên bề mặt đĩa thạch XLD (B.6) sao cho thu được các khuẩn lạc riêng rẽ. Thực hiện tương tự với môi trường đĩa thạch chọn lọc thứ hai.

CHÚ THÍCH 1: Để thu được các khuẩn lạc riêng rẽ, có thể sử dụng các đĩa Petri kích thước lớn (đường kính khoảng 140 mm) đựng môi trường thạch chọn lọc hoặc dùng hai đĩa kích thước trung bình (đường kính khoảng 90 mm).

Lật úp các đĩa XLD và ủ ở 37 °C (6.3) trong 24 h \pm 3 h.

Ủ môi trường đĩa thạch chọn lọc thứ hai theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nếu môi trường tăng sinh chọn lọc đã ủ thêm 24 h thì thực hiện quy trình nuôi cấy trên thạch chọn lọc tương tự như mô tả ở trên.

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

CHÚ THÍCH 2: Trên đĩa thạch XLD các biến thể *Salmonella* âm tính H₂S phát triển có khuẩn lạc màu hồng với tâm màu hồng đậm, *Salmonella* dương tính lactose có khuẩn lạc màu vàng, có hoặc không có tâm màu đen. Sự xuất hiện các kiểu hình này được nêu trong Bảng 1.

Sau một khoảng thời gian ủ thích hợp kiểm tra môi trường đĩa thạch chọn lọc thứ hai về sự có mặt của các khuẩn lạc có các đặc trưng điển hình có thể coi là *Salmonella* giả định.

9.4.3 Quy trình đối với các mẫu từ giai đoạn sản xuất ban đầu

Từ các vị trí cho thấy các khuẩn lạc dương tính, xác định điểm có quang đục rộng nhất dùng que cấy vòng 1 μ l (6.10) nhúng vào mép trong quang đục của các khuẩn lạc dương tính trên thạch MSR/V (9.3.3). Rút que cấy vòng ra sao cho không lấy theo các mảng lớn của thạch MSR/V. Cấy lên bề mặt

đĩa thạch XLD (B.6) sao cho thu được các khuẩn lạc riêng rẽ. Thực hiện tương tự với môi trường đĩa thạch chọn lọc thứ hai.

Lật úp các đĩa XLD và ủ ở 37 °C (6.3) trong 24 h ± 3 h.

Ủ môi trường đĩa thạch chọn lọc thứ hai theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đặt lại các đĩa MSRV âm tính vào tủ ấm ở 41,5 °C và ủ tiếp 24 h ± 3 h. Thực hiện quy trình nuôi cấy trên thạch chọn lọc nếu sau khi ủ 48 h trên các đĩa MSRV không có khuẩn lạc dương tính.

Các khuẩn lạc *Salmonella* điển hình trên thạch XLD có tâm màu đen và quầng màu đỏ nhạt trong suốt do sự đổi màu của chất chỉ thị.

CHÚ THÍCH: Trên đĩa thạch XLD các biến thể *Salmonella* âm tính H₂S phát triển có khuẩn lạc màu hồng với tâm màu hồng đậm, *Salmonella* dương tính lactose có khuẩn lạc màu vàng, có hoặc không có tâm màu đen. Sự xuất hiện các kiểu hình này được nêu trong Bảng 1.

Sau một khoảng thời gian ủ thích hợp, kiểm tra môi trường đĩa thạch chọn lọc thứ hai về sự có mặt của các khuẩn lạc có các đặc trưng điển hình có thể coi là *Salmonella* giả định.

9.5 Khẳng định

9.5.1 Yêu cầu chung

Việc kết hợp các kết quả thử nghiệm sinh hóa và huyết thanh cho thấy vi khuẩn phân lập được có thuộc chi *Salmonella* hay không. Để nhận dạng các chủng *Salmonella* cần xác định đầy đủ typ huyết thanh. Hướng dẫn xác định typ huyết thanh được quy định trong TCVN 10780-3 (ISO/TR 6579-3)^[24].

Đối với một số môi trường khẳng định được quy định trong 9.5.3 và trong B.8 đến B.12, có thể sử dụng các chế phẩm có bán sẵn thay thế để khẳng định sinh hóa đối với *Salmonella*. Cho phép sử dụng các chế phẩm này nếu hiệu năng của việc khẳng định sinh hóa đối với *Salmonella* được kiểm tra xác nhận trước khi sử dụng.

Để phân biệt rõ các phản ứng sinh hóa âm tính và dương tính, nên kiểm tra xác nhận các phản ứng của môi trường đối với từng phép thử sinh hóa bằng các chủng kiểm chứng âm và kiểm chứng dương đặc trưng.

CHÚ THÍCH 1: Việc nhận dạng các khuẩn lạc *Salmonella* cần có nhiều kinh nghiệm vì hình dạng bên ngoài của chúng có thể khác nhau không chỉ từ serovar này đến serovar khác mà còn từ mẹ này đến mẹ khác của môi trường nuôi cấy chọn lọc được sử dụng.

Nếu thấy đáng tin cậy, có thể sử dụng các bộ thử nhận dạng có bán sẵn để kiểm tra sinh hoá *Salmonella* [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

CHÚ THÍCH 2: Có thể sử dụng các quy trình thay thế để khẳng định *Salmonella* spp. nếu các quy trình này đã được kiểm tra xác nhận sự phù hợp [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

9.5.2 Chọn khuẩn lạc để khẳng định

Đánh dấu các khuẩn lạc nghi ngờ trên mỗi đĩa (9.4). Chọn ít nhất một khuẩn lạc điển hình hoặc nghi ngờ để cấy truyền và khẳng định. Nếu khuẩn lạc này âm tính thì chọn nhiều hơn bốn khuẩn lạc nghi ngờ để chắc chắn rằng các khuẩn lạc này đã được cấy truyền trên hỗn hợp các môi trường phân lập/môi trường tăng sinh chọn lọc khác nhau cho thấy các khuẩn lạc nghi ngờ phát triển.

Cấy ria các khuẩn lạc được chọn trên bề mặt môi trường thạch không chọn lọc đã được làm khô trước (B.7), sao cho các khuẩn lạc phát triển riêng rẽ. Ủ các đĩa đã cấy ở nhiệt độ từ 34 °C đến 38 °C (6.3) trong 24 h ± 3 h.

Cách khác, nếu có các khuẩn lạc riêng rẽ (nuôi cấy thuần) trên môi trường đĩa thạch chọn lọc (9.4) thì có thể thực hiện khẳng định sinh hóa trực tiếp với khuẩn lạc riêng rẽ nghi ngờ từ môi trường đĩa thạch chọn lọc. Sau đó có thể thực hiện bước nuôi cấy trên môi trường thạch không chọn lọc song song với các phép thử sinh hóa để kiểm tra độ thuần của khuẩn lạc từ môi trường thạch chọn lọc.

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

CHÚ THÍCH: Đối với mục đích nghiên cứu dịch tễ học hoặc điều tra các vụ dịch bùng phát, việc khẳng định thêm các khuẩn lạc có thể hữu ích, ví dụ: nấm khuẩn lạc điển hình hoặc nghi ngờ từ mỗi hỗn hợp của môi trường tăng sinh chọn lọc/môi trường phân lập.

9.5.3 Phép thử sinh hoá

9.5.3.1 Yêu cầu chung

Cấy vào môi trường khẳng định sinh hóa từng khuẩn lạc được cấy truyền từ các khuẩn lạc đã chọn trong 9.4 hoặc 9.5.2. Để khẳng định *Salmonella* spp., phải thực hiện ít nhất các phép thử quy định trong 9.5.3.2 đến 9.5.3.4. Cũng có thể cần thực hiện các phép thử quy định trong 9.5.3.5 và 9.5.3.6 khi các phép thử khẳng định khác không cho kết quả rõ ràng.

9.5.3.2 Thạch TSI (B.8)

Cấy ria trên bề mặt nghiêng của thạch và cấy đâm sâu xuống đáy. Ủ ở 37 °C (6.3) trong 24 h ± 3 h.

Diễn giải các thay đổi trong môi trường như sau:

a) Cấy đâm sâu

- | | |
|-----------------------------|--|
| – màu vàng | glucose dương tính (lên men glucose); |
| – màu đỏ hoặc không đổi màu | glucose âm tính (không lên men glucose); |
| – màu đen | sinh hydro sulfid; |
| – bọt khí hoặc nứt thạch | sinh khí từ glucose |

Bảng 1 – Diễn giải các phép thử sinh hóa

Phép thử ^a (Từ 9.5.3.2 đến 9.5.3.6)	Chủng <i>Salmonella</i>													
	S. Typhi		S. Paratyphi A		S. Paratyphi B		S. Paratyphi C		S. Gallinarum biovar gallinarum ^b		S. Gallinarum biovar pullorum ^b		Các chủng khác ^g	
	Phản ứng	% ^c	Phản ứng	% ^c	Phản ứng	% ^d	Phản ứng	% ^d	Phản ứng	% ^c	Phản ứng	% ^c	Phản ứng	% ^c
TSI sinh axit từ glucose	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100
TSI sinh khí từ glucose	- ^e	0	+	96,1	+	96,1	+	96,1	-	0	+	95,1	+	92
TSI sinh axit từ lactose	-	2	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1 ^h
TSI sinh axit từ sucrose	-	0	-	0,6	-	0,6	-	0,6	-	0,6	-	0,6	-	1
TSI tạo hydro sulfid	+	97	-	10	+	100	+	100	V ^f		V ^f		+	92
Thủy phân ure	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1
Lyzin đã khử nhóm cacboxyl	+	98	-	0	+	95	+	100	+	95	+	95	+	95
Phản ứng β -galactosidase	-	0	-	0	-		-		-	<10	-	<10	-	2 ^h
Sinh indol	-	0	-	1,2	-	1,2	-	1,2	-	1,2	-	1,2	-	1

^a Từ tài liệu tham khảo [13] và [14].

^b Từ tài liệu tham khảo [11], [13] và [14].

^c Tỷ lệ phần trăm chứng tỏ không phải tất cả các serovar *Salmonella* phân lập được đều cho phản ứng + hoặc -. Các phản ứng cũng có thể khác nhau giữa và trong các serovar.

^d Cột trống: không có sẵn dữ liệu về tỷ lệ phần trăm.

^e *Salmonella* Typhi là vi khuẩn kỵ khí.

^f V là các kết quả biến thiên.

^g Để phân biệt các loài *Salmonella* và các phân loài khác, xem TCVN 10780 (ISO/TR 6579-3)^[24].

^h Các *Salmonella enterica* phân loài *arizonae* và *diarizonae* luôn cho phản ứng β -galactosidase dương tính. Một số chủng *Salmonella enterica* phân loài *arizonae* và *diarizonae* có thể lên men lactose.

Hiện có một số quy trình thực hiện phép thử β -galactosidase. Ví dụ như sau:

Hòa một vòng que cấy đầy khuẩn lạc nghi ngờ vào một ống có chứa 0,25 ml dung dịch nước muối (B.13).

Thêm một giọt toluen và lắc ống. Đặt ống vào trong nồi cách thủy (6.6) cài đặt ở 37 °C và để vài phút (khoảng 5 min). Thêm 0,25 ml thuốc thử để phát hiện β -galactosidase (B.11) và trộn đều.

Đặt lại ống vào nồi cách thủy (6.6) cài đặt ở 37 °C và để tới 24 h.

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

Nếu sử dụng các đĩa giấy đã chuẩn bị sẵn để phát hiện β -galactosidase thì thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

9.5.3.6 Môi trường thử phản ứng indol (B.12) (tùy chọn)

Phép thử indol có thể được sử dụng khi cần phân biệt *Salmonella* (thường phản ứng âm tính indol, xem Bảng 1) với *Escherichia coli* và *Citrobacter* (cả hai phản ứng dương tính indol) vì các vi sinh vật này có thể cho các phản ứng điển hình trên môi trường phân lập *Salmonella*.

Cấy khuẩn lạc nghi ngờ vào ống chứa 5 ml môi trường trypton/tryptophan (B.12.1).

Ủ ở 37 °C (6.3) trong 24 h \pm 3 h. Sau khi ủ, thêm 1 ml thuốc thử Kovacs (B.12.2).

Sự xuất hiện một vòng màu đỏ (lớp bề mặt) chứng tỏ phản ứng dương tính và một vòng màu nâu vàng (lớp bề mặt) chứng tỏ phản ứng âm tính.

9.5.4 Phép thử huyết thanh

9.5.4.1 Yêu cầu chung

Các khuẩn lạc thuần (9.5.2) cho thấy các phản ứng sinh hóa điển hình đối với *Salmonella* (9.5.3) được thử nghiệm tiếp để phát hiện sự có mặt của các kháng nguyên *Salmonella* O và H (và cũng như với kháng nguyên Vi, tại những nơi dự kiến có mặt *Salmonella* Typhi trong nguồn cung cấp thực phẩm) bằng cách ngưng kết với kháng nguyên đa giá (B.14) trên lam kính. Các khuẩn lạc thuần được nuôi cấy trên môi trường thạch không chọn lọc (B.7) và được kiểm tra khả năng tự ngưng kết. Loại bỏ các chủng tự ngưng kết mà không được thử nghiệm tiếp để phát hiện sự có mặt của các kháng nguyên *Salmonella*. Sử dụng kháng nguyên theo hướng dẫn của nhà sản xuất nếu khác với phương pháp được mô tả dưới đây để phát hiện sự có mặt của các kháng nguyên *Salmonella* O và H (và với cả kháng nguyên Vi nếu cần,).

TCVN 10780-1:2017

Các phép thử sau đây (9.5.4.2 đến 9.5.4.5) là yêu cầu tối thiểu để thử nghiệm huyết thanh của *Salmonella* spp.

Hướng dẫn thêm về việc khẳng định huyết thanh và xác định typ huyết thanh được nêu trong TCVN 10780-3 (ISO/TR 6579-3)^[24].

9.5.4.2 Loại bỏ các chủng tự ngưng kết

Cho một giọt dung dịch nước muối (B.13) lên lam kính thủy tinh sạch. Dùng que cấy vòng trộn đều dung dịch nước muối với khuẩn lạc cần thử nghiệm, để thu được huyền phù đục và đồng nhất.

Lắc nhẹ lam kính từ 5 s đến 60 s (tùy theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Quan sát huyền phù trên nền màu đen. Nếu các vi khuẩn kết dính thành hạt trong huyền phù thì chủng này được xem là tự ngưng kết và việc khẳng định huyết thanh sẽ phức tạp. Thông tin bổ sung về việc xử lý các chủng tự ngưng kết có thể xem TCVN 10780-3 (ISO/TR 6579-3)^[24].

9.5.4.3 Kiểm tra các kháng nguyên O

Kiểm tra sự có mặt của kháng nguyên O với khuẩn lạc thuần đã xác định không có khả năng tự ngưng kết, tiến hành theo 9.5.4.2, sử dụng một giọt huyết thanh kháng nguyên O đa giá (B.14) thay cho dung dịch nước muối.

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

9.5.4.4 Kiểm tra các kháng nguyên Vi (tùy chọn)

Kiểm tra sự có mặt của kháng nguyên Vi với khuẩn lạc thuần đã xác định không có khả năng tự ngưng kết, tiến hành theo 9.5.4.2, sử dụng một giọt huyết thanh kháng nguyên Vi (B.14) thay cho dung dịch nước muối.

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

9.5.4.5 Kiểm tra các kháng nguyên H

Kiểm tra sự có mặt của kháng nguyên H với khuẩn lạc thuần đã xác định không có khả năng tự ngưng kết, tiến hành theo 9.5.4.2, sử dụng một giọt huyết thanh kháng nguyên H đa giá (B.14) thay cho dung dịch nước muối.

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

9.5.5 Diễn giải các phản ứng, sinh hoá và huyết thanh

Bảng 2 diễn giải các kết quả của các phép thử khẳng định (9.5.3 và 9.5.4) với các khuẩn lạc đã thử nghiệm (9.5.2).

Bảng 2 – Diễn giải các kết quả các phép thử khẳng định

Phản ứng sinh hoá	Tự ngưng kết	Phản ứng huyết thanh	Diễn giải
Điển hình	Không	Kháng nguyên O và H dương tính (và Vi dương tính nếu thử nghiệm)	Các chủng được coi là <i>Salmonella</i>
Điển hình	Không	Kháng nguyên O và/hoặc H âm tính	Có thể là <i>Salmonella</i>
Điển hình	Có	Không thử nghiệm vi tự ngưng kết (xem 9.5.4.2)	
Phản ứng không điển hình	–	–	Không được coi là <i>Salmonella</i>

9.5.6 Xác định typ huyết thanh

Các chủng đã được khẳng định là *Salmonella* spp. (xem Bảng 2) có thể thử nghiệm tiếp để xác định serovar. Hướng dẫn xác định typ huyết thanh được quy định trong TCVN 10780-3 (ISO/TR 6579-3)^[24].

Nếu cần, các chủng đã khẳng định có thể được gửi đến trung tâm kiểm chứng về *Salmonella* đã được công nhận để xác định typ (typ huyết thanh, typ phân tử). Nếu các chủng được gửi đến trung tâm kiểm chứng thì phải kèm theo tất cả thông tin liên quan đến các chủng đó như kết quả khẳng định, nguồn phân lập chủng và có liên quan đến việc phân lập từ đợt bùng phát dịch.

10 Biểu thị kết quả

Căn cứ vào phần diễn giải kết quả, chỉ rõ có mặt hoặc không có mặt *Salmonella* trong phần mẫu thử x g hoặc x ml sản phẩm [xem TCVN 6404 (ISO 7218)] hoặc trên diện tích bề mặt hoặc trong mẫu vật phẩm (ví dụ: túi bọc ủng).

11 Đặc tính hiệu năng của phương pháp

11.1 Nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Các đặc tính hiệu năng của phương pháp đã được xác định trong các nghiên cứu liên phòng thử nghiệm để xác định độ đặc hiệu, độ nhạy và LOD₅₀ của phương pháp (xem Tài liệu tham khảo [6] và [7]). Dữ liệu được tóm tắt trong Phụ lục C. Các giá trị thu được từ các nghiên cứu liên phòng này có thể không áp dụng được cho các loại nền mẫu khác với nền mẫu nêu trong Phụ lục C. Ngoài ra, các đặc

tính hiệu năng nêu trong Phụ lục C đã xác định trong mỗi phần 25 g (hoặc 25 ml) mẫu thử. Khi sử dụng các phần mẫu thử lớn hơn thì các đặc tính hiệu năng có thể sẽ khác.

11.2 Độ nhạy

Độ nhạy được xác định bằng số mẫu dương tính chia cho số mẫu được thử nghiệm ở mức nhiễm đã cho. Các kết quả phụ thuộc vào mức nhiễm của mẫu.

11.3 Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu được xác định bằng số mẫu âm tính chia cho số mẫu trắng được thử nghiệm.

11.4 LOD₅₀

LOD₅₀ (mức phát hiện) là nồng độ (cfu/phần mẫu thử) mà ở mức này có khả năng phát hiện đến 50 %.

12 Báo cáo thử nghiệm

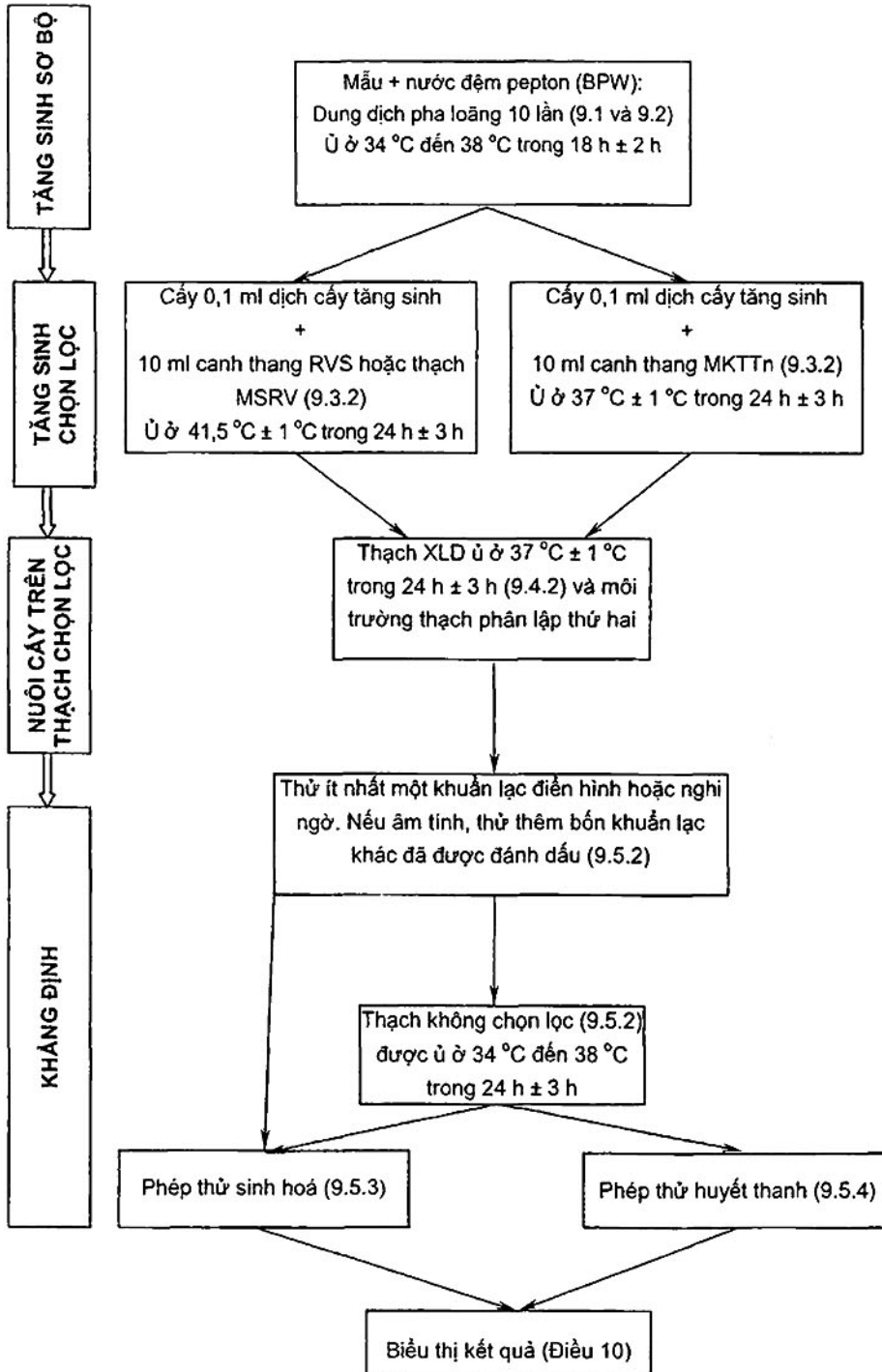
Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ:

- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- cỡ phần mẫu thử và/hoặc bản chất của mẫu được kiểm tra;
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi sai lệch trong môi trường tăng sinh hoặc các điều kiện ủ đã sử dụng;
- mọi chi tiết 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.

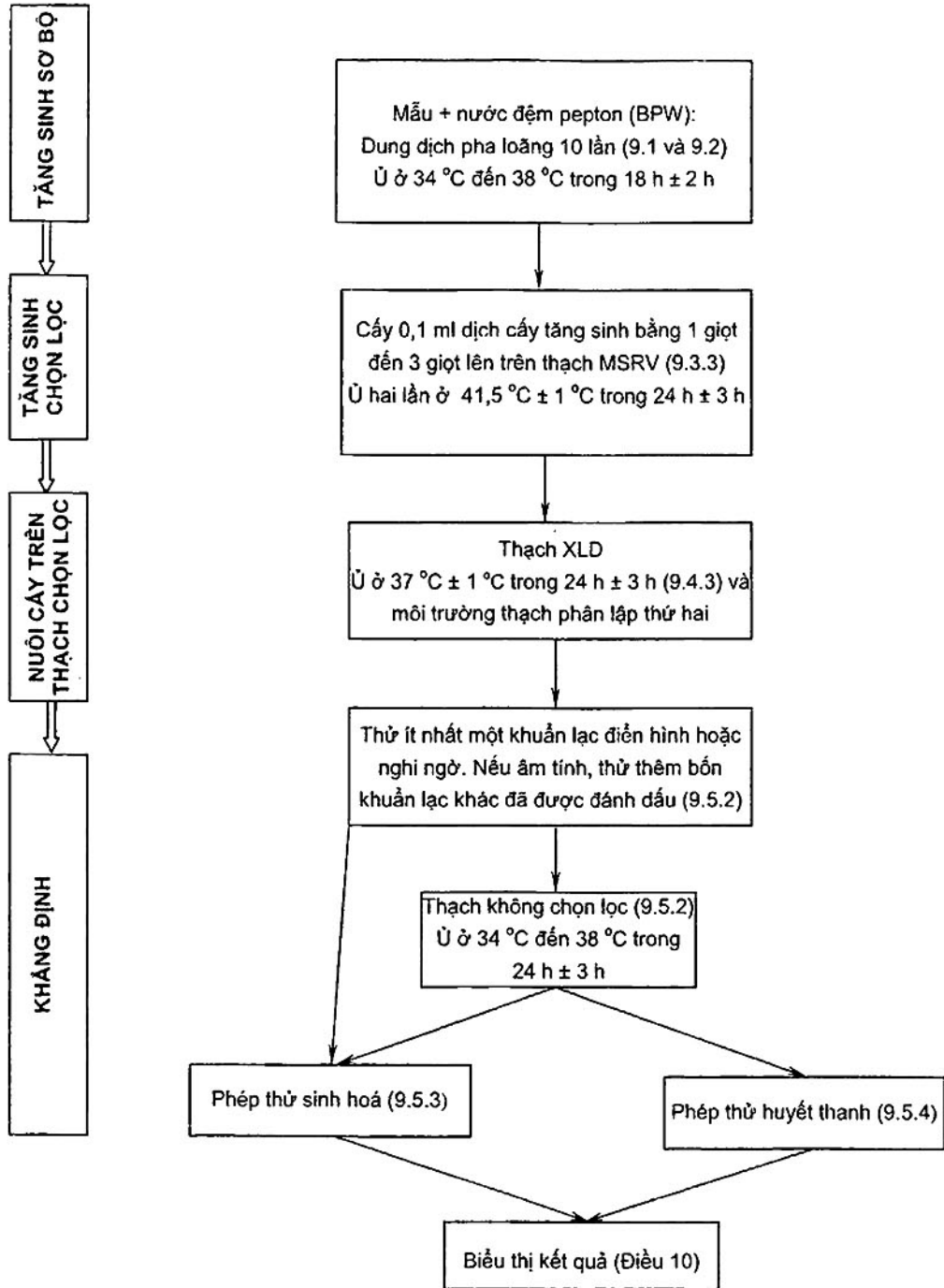
Phụ lục A

(quy định)

Sơ đồ cách tiến hành



Hình A.1 – Sơ đồ quy trình phát hiện *Salmonella* trong mẫu thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và mẫu môi trường từ khu vực chế biến thực phẩm



Hình A.2 – Sơ đồ quy trình phát hiện *Salmonella* trong mẫu phân động vật và mẫu môi trường từ giai đoạn sản xuất ban đầu

Phụ lục B

(quy định)

Môi trường nuôi cấy và thuốc thử**B.1 Yêu cầu chung**

Có thể áp dụng các quy định chung trong TCVN 8128 (ISO 11133) để chuẩn bị và thử nghiệm hiệu năng môi trường nuôi cấy quy định trong Phụ lục này. Nếu môi trường nuôi cấy hoặc thuốc thử được chuẩn bị từ môi trường/thuốc thử hoàn chỉnh khô hoặc nếu sử dụng môi trường/thuốc thử đã chuẩn bị sẵn thì phải tuân thủ các hướng dẫn của nhà sản xuất về chuẩn bị, bảo quản, cách sử dụng và hạn sử dụng.

Thời hạn sử dụng của các môi trường nêu trong phụ lục này đã được nêu trong một số nghiên cứu. Người sử dụng phải kiểm tra lại điều này theo các điều kiện bảo quản của riêng mình [như được quy định trong TCVN 8128 (ISO 11133)].

Thử nghiệm hiệu năng để đảm bảo chất lượng môi trường nuôi cấy được quy định trong B.15.

B.2 Dung dịch nước đệm pepton (BPW)**B.2.1 Thành phần**

Pepton ^a	10,0 g
Natri clorua	5,0 g
Dinatri hydro phosphat ngậm 12 phân tử nước (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O) ^b	9,0 g
Kali dihydro phosphat (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
Nước	1 000 ml

^a Ví dụ: Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym.

^b Nếu sử dụng dinatri hydro phosphat với hàm lượng nước khác nhau thì điều chỉnh khối lượng của thành phần tương ứng. Ví dụ, trong trường hợp dinatri hydro phosphat (Na₂HPO₄) khan thì sử dụng 3,57 g.

B.2.2 Chuẩn bị

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

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

Phân phối môi trường vào các bình (6.12) có dung tích thích hợp để chứa được phần mẫu thử cần thiết cho thử nghiệm.

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

Bảo quản môi trường trong vật chứa kín (6.12) ở 5 °C (6.8) đến 6 tháng.

B.3 Môi trường Rappaport-Vassiliadis với đậu tương (canh thang RVS)**B.3.1 Dung dịch A****B.3.1.1 Thành phần**

Sản phẩm thủy phân đậu tương bằng enzym	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.3.1.2 Chuẩn bị

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

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

B.3.2 Dung dịch B**B.3.2.1 Thành phần**

Magie clorua ngậm 6 phân tử nước ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	400 g
Nước	1 000 ml

B.3.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan magie clorua trong nước.

Do muối này hút ẩm mạnh, nên cần hoà tan hết lượng $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ trong hộp vừa mới mở, theo công thức. Ví dụ: 250 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 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 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Bảo quản dung dịch này trong lọ thủy tinh tối màu có nắp đậy kín ở nhiệt độ phòng ít nhất hai năm.

B.3.3 Dung dịch C**B.3.3.1 Thành phần**

Xanh malachit oxalat	0,4 g
Nước	100 ml

B.3.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan xanh malachit oxalat trong nước.

Bảo quản dung dịch này trong lọ thủy tinh tối màu ở nhiệt độ phòng ít nhất 8 tháng.

B.3.4 Môi trường hoàn chỉnh**B.3.4.1 Thành phần**

Dung dịch A (B.3.1)	1 000 ml
Dung dịch B (B.3.2)	100 ml
Dung dịch C (B.3.3)	10 ml

B.3.4.2 Chuẩn bị

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

Chỉnh pH, nếu cần, sao cho sau khi khử trùng, pH là $5,2 \pm 0,2$ ở 20 °C đến 25 °C.

Phân phối môi trường này vào các ống hoặc bình (6.12) có dung tích thích hợp để chứa được các lượng mẫu thử cần thiết cho thử nghiệm, ví dụ: mỗi ống 10 ml.

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

Bảo quản môi trường đã chuẩn bị trong ống hoặc bình đậy kín ở 5 °C (6.8) đến 3 tháng.

CHÚ THÍCH: Thành phần của môi trường cuối cùng là: sản phẩm thủy phân đậu tương bằng enzym: 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 (MgCl_2) khan: 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; xanh malachit oxalat: 0,036 g/l.

B.4 Thạch Rappaport-Vassiliadis bán đặc cải biến (MSRV)

CHÚ THÍCH: Xem Tài liệu tham khảo [12].

B.4.1 Dung dịch A**B.4.1.1 Thành phần**

Sản phẩm thủy phân mô động vật và thực vật bằng enzym	4,6 g
Sản phẩm thủy phân casein bằng axit	4,6 g
Natri clorua	7,3 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	1,5 g
Nước	890 ml

B.4.1.2 Chuẩn bị

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

Dung dịch phải được chuẩn bị cùng ngày chuẩn bị thạch MSR/V hoàn chỉnh.

B.4.2 Dung dịch B**B.4.2.1 Thành phần**

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

B.4.2.2 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: 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 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

Bảo quản dung dịch này trong lọ thủy tinh tối màu có nắp đậy kín ở nhiệt độ phòng ít nhất 2 năm.

B.4.3 Dung dịch C**B.4.3.1 Thành phần**

Xanh malachit oxalat	0,4 g
Nước	100 ml

B.4.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan xanh malachit oxalat 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.4.4 Môi trường cơ bản**B.4.4.1 Thành phần**

Dung dịch A (B.4.1)	890 ml
Dung dịch B (B.4.2)	100 ml
Dung dịch C (B.4.3)	10 ml
Thạch ^a	2,7 g

^a Có thể cần phải xác định thực nghiệm nồng độ thạch cần thiết tối ưu cho sự di động của *Salmonella* (ví dụ: khi sử dụng mẻ thạch chưa biết sức đông).

B.4.4.2 Chuẩn bị

Cho 100 ml dung dịch B và 10 ml dung dịch C vào 890 ml dung dịch A, khuấy trộn.

Thêm thạch và tạo huyền phù.

Chỉnh pH, nếu cần, sao cho sau khi khử trùng, pH là 5,2 (từ 5,1 đến 5,4) ở nhiệt độ 20 °C đến 25 °C.

Đun nóng và khuấy trộn. **Không hấp áp lực.**

Không giữ môi trường ở nhiệt độ cao lâu hơn thời gian cần thiết.

Làm nguội môi trường đến nhiệt độ trong khoảng từ 47 °C đến 50 °C trong nồi cách thủy (6.5).

B.4.5 Dung dịch Novobioxin**B.4.5.1 Thành phần**

Muối natri novobioxin	0,05 g
Nước	10 ml

B.4.5.2 Chuẩn bị

Hoà tan muối natri novobioxin trong nước.

Khử trùng bằng cách lọc qua bộ lọc màng cỡ lỗ 0,22 µm.

Dung dịch này có thể bền đến 4 tuần khi được bảo quản ở 5 °C (6.8) hoặc đến 1 năm nếu bảo quản với các lượng nhỏ (ví dụ: 2 ml) ở -20 °C (6.9).

B.4.6 Môi trường hoàn chỉnh**B.4.6.1 Thành phần**

Môi trường cơ bản (B.4.4)	1 000 ml
Dung dịch novobioxin (B.4.5)	2 ml

B.4.6.2 Chuẩn bị

Bằng kỹ thuật vô trùng, cho 2 ml dung dịch novobioxin (B.4.5) vào 1 000 ml môi trường cơ bản (B.4.4) ở 47 °C đến 50 °C. Trộn kỹ. Nồng độ cuối cùng của novobioxin trong môi trường hoàn chỉnh là 10 mg/l.

pH cuối cùng phải là 5,2 (từ 5,1 đến 5,4) ở nhiệt độ 20 °C đến 25 °C.

Rót môi trường vào các đĩa Petri vô trùng có đường kính 90 mm (6.14), mỗi đĩa từ 15 ml đến 20 ml.

Để môi trường đông đặc trước khi di chuyển và thao tác cẩn thận.

Bảo quản các đĩa với nắp hướng lên trên và bảo quản ở nơi tối không bị khô đến 2 tuần ở 5 °C (6.8).

Không lật úp các đĩa vì thạch bán đặc quá mềm.

Không sử dụng đĩa có chứa thạch bán đặc đã bị hóa lỏng hoặc bị phân lớp.

Ngay trước khi sử dụng và nếu thấy bề mặt thạch ướt thì cẩn thận làm khô bề mặt thạch, ví dụ bằng cách hé nắp đĩa hướng mặt thạch lên trên để trong tủ thông khí. Cẩn thận không để môi trường khô quá mức.

CHÚ THÍCH 1: Thành phần của thạch MSRV, như nêu trong Tài liệu tham khảo [12], có chứa novobioxin 20 mg/l. Tuy nhiên, theo quan điểm khoa học, hàm lượng novobioxin tốt nhất là 10 mg/l. Các nghiên cứu cho thấy các vùng lan rộng hơn trên thạch MSRV ở nồng độ novobioxin thấp hơn⁽²³⁾ vì tác động ức chế của novobioxin tới tính di động của vi khuẩn⁽²²⁾ ít hơn.

CHÚ THÍCH 2: Thành phần môi trường cuối cùng: sản phẩm thủy phân mô động vật và mô thực vật bằng enzym 4,6 g/l, sản phẩm thủy phân casein bằng axit 4,6 g/l, natri clorua (NaCl) 7,3 g/l, kali dihydro phosphat (KH₂PO₄) 1,5 g/l, clorua magie khan (MgCl₂) 10,9 g/l hoặc magie clorua ngậm 6 phân tử nước (MgCl₂.6H₂O) 28,6 g/l, xanh malachit oxalat 0,04 g/l, muối natri novobioxin 0,01 g/l và thạch 2,7 g/l.

B.5 Canh thang Novobioxin tetrathionat muller-kauffmann (canh thang MKTTn)

CHÚ THÍCH: Xem Tài liệu tham khảo [14].

B.5.1 Môi trường cơ bản

B.5.1.1 Thành phần

Chất chiết thịt	4,3 g
Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym	8,6 g
Natri clorua (NaCl)	2,6 g
Canxi cacbonat (CaCO ₃)	38,7 g
Natri thiosulfat ngậm 5 phân tử nước (Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O)	47,8 g
Mật bò dùng cho vi khuẩn học	4,78 g
Xanh Brilliant	9,6 mg
Nước	1 000 ml

B.5.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách gia nhiệt có khuấy trộn liên tục cho đến khi môi trường bắt đầu sôi. Tránh quá nhiệt.

Chỉnh pH đến $8,0 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần.

Trộn kỹ môi trường.

Bảo quản môi trường cơ bản trong bình đậy kín (6.12) ở nhiệt độ $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6.8) đến 3 tháng.

B.5.2 Dung dịch Iot-iodua

B.5.2.1 Thành phần

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

B.5.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan hoàn toàn kali iodua trong 10 ml nước, sau đó bổ sung Iot và pha loãng bằng nước vô trùng đến 100 ml. Không đun nóng.

Bảo quản dung dịch đã chuẩn bị trong bình đậy kín (6.12), ở nơi tối đến 1 năm.

B.5.3 Dung dịch Novobioxin

B.5.3.1 Thành phần

Muối natri novobioxin	0,04 g
Nước	5 ml

B.5.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan muối natri novobioxin trong nước.

Khử trùng bằng cách lọc qua bộ lọc màng cỡ lỗ $0,22\text{ }\mu\text{m}$.

Dung dịch này có thể bền đến 4 tuần khi được bảo quản ở $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6.8) hoặc đến 1 năm nếu bảo quản với các lượng nhỏ (ví dụ: 2 ml) ở $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6.9).

B.5.4 Môi trường hoàn chỉnh

B.5.4.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (B.5.1)	1 000 ml
Dung dịch Iot-iodua (B.5.2)	20 ml
Dung dịch novobioxin (B.5.3)	5 ml

B.5.4.2 Chuẩn bị

Bằng kỹ thuật vô trùng, cho 5 ml dung dịch novobioxin (B.5.3) vào 1 000 ml môi trường cơ bản (B.5.1). Trộn, sau đó bổ sung 20 ml dung dịch iot-iodua (B.5.2). Trộn kỹ. Nồng độ cuối cùng của novobioxin trong môi trường hoàn chỉnh là 40 mg/l.

Phân phối môi trường một cách vô trùng vào vật chứa (6.12) có dung tích thích hợp để thu được các lượng mẫu cần thiết cho thử nghiệm, ví dụ: mỗi ống 10 ml. Sau khi chuẩn bị, pH của canh thang MKTTn hoàn chỉnh phải xấp xỉ 8,0. Nếu môi trường hoàn chỉnh chưa được sử dụng ngay thì bảo quản nơi tối ở nhiệt độ 5 °C (6.8). pH có thể giảm trong quá trình bảo quản do các phản ứng hóa học. Không sử dụng môi trường hoàn chỉnh khi pH giảm xuống dưới 7,0.

B.6 Thạch Deoxycolat Lyzin Xylose (thạch XLD)

CHÚ THÍCH: Xem Tài liệu tham khảo [14].

B.6.1 Thành phần

Chất chiết nấm men	3,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Xylose	3,75 g
Lactose	7,5 g
Sucrose	7,5 g
L-Lyzin hydroclorua	5,0 g
Natri thiosulfat	6,8 g
Sắt (III) amoni xitrat	0,8 g
Đỏ phenol	0,08 g
Natri deoxycolat	1,0 g
Thạch	từ 9 g đến 18 g ^a
Nước	1 000 ml

^a Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

B.6.2 Chuẩn bị

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

Chỉnh pH, nếu cần, sao cho pH cuối cùng là $7,4 \pm 0,2$ ở 25 °C.

Rót môi trường cơ bản vào các ống hoặc các bình (6.12) có dung tích thích hợp.

B.6.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Làm nguội môi trường trong nồi cách thủy (6.5) trong khoảng từ 47 °C đến 50 °C và rót vào các đĩa Petri (6.14) vô trùng. Để cho đông đặc.

Ngay trước khi sử dụng, cẩn thận làm khô các đĩa thạch (tốt nhất hé nắp ra và úp ngược đĩa thạch xuống) cho vào tủ (6.2) ở nhiệt độ từ 25 °C đến 50 °C cho đến khi bề mặt thạch khô.

Bảo quản các đĩa thạch không bị khô ở 5 °C (6.8) đến bốn tuần.

B.7 Thạch dinh dưỡng (ví dụ môi trường không chọn lọc)

B.7.1 Thành phần

Chất chiết thịt	3,0 g
Pepton	5,0 g
Natri clorua (NaCl) (tùy chọn)	5,0 g
Thạch	từ 9 g đến 18 g ^a
Nước	1 000 ml
^a Tùy thuộc vào sức đông của thạch.	

B.7.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng có khuấy trộn liên tục.

Sau khi khử trùng, chỉnh pH đến $7,0 \pm 0,2$ ở 25 °C, nếu cần.

Chuyển môi trường nuôi cấy vào trong các ống hoặc bình (6.12) có dung tích thích hợp.

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

B.7.3 Chuẩn bị các đĩa thạch dinh dưỡng

Làm nguội môi trường trong nồi cách thủy (6.5) trong khoảng từ 47 °C đến 50 °C, xoay đều và rót vào các đĩa Petri vô trùng (6.14). Để cho đông đặc.

Ngay trước khi sử dụng, cẩn thận làm khô các đĩa thạch (tốt nhất hé nắp ra và úp ngược đĩa thạch xuống) cho vào tủ (6.2) ở nhiệt độ từ 25 °C đến 50 °C cho đến khi bề mặt thạch khô.

Bảo quản các đĩa thạch không bị khô ở 5 °C (6.8) đến bốn tuần.

B.8 Thạch TSI**B.8.1 Thành phần**

Chất chiết thịt	3,0 g
Chất chiết nấm men	3,0 g
Pepton	20,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Lactose	10,0 g
Sucrose	10,0 g
Glucose	1,0 g
Sắt (III) xitrat	0,3 g
Natri thiosulphat	0,3 g
Đỏ phenol	0,024 g
Thạch	từ 9 g đến 18 g ^a
Nước	1 000 ml

^a Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

B.8.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng có khuấy trộn liên tục.

Chỉnh pH, nếu cần, sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,4 \pm 0,2$ ở 25 °C.

Phân phối các lượng 10 ml môi trường vào các ống nghiệm hoặc chai (6.12).

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

Đặt nghiêng để phần chân thạch dài từ 2,5 cm đến khoảng 5 cm.

Bảo quản các đĩa không bị khô ở 5 °C trong tủ lạnh (6.8) đến bốn tuần.

CHÚ THÍCH: Cách khác, có thể sử dụng thạch sắt/đường hai lần (Kligler-Hajna)

B.9 Thạch urê (Christensen)**B.9.1 Môi trường cơ bản****B.9.1.1 Thành phần cơ bản**

Pepton ^{a)}	1,0 g
Glucose	1,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Kali dihydro phosphat (KH ₂ PO ₄)	2,0 g
Đỏ phenol	0,012 g
Thạch	9 g đến 18 g ^b
Nước	1 000 ml

^a Ví dụ: Sản phẩm thủy phân gelatin bằng enzym.

^b Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

B.9.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên hoặc môi trường cơ bản hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng có khuấy liên tục.

Chỉnh pH, nếu cần, sao cho sau khi khử trùng, pH là $6,8 \pm 0,2$ ở 25 °C.

Rót môi trường vào các ống nghiệm hoặc chai (6.12) có dung tích thích hợp.

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

Bảo quản môi trường cơ bản trong ống hoặc bình đậy kín ở 5 °C (6.8) đến ba tháng.

B.9.2 Dung dịch urê**B.9.2.1 Thành phần**

Urê	400 g
Nước, để có thể tích cuối	1 000 ml

B.9.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan urê trong nước. Khử trùng bằng cách lọc qua bộ lọc màng cỡ lỗ 0,22 µm.

Xem TCVN 8128 (ISO 11133).

B.9.3 Môi trường hoàn chỉnh**B.9.3.1 Thành phần**

Môi trường cơ bản (B.9.1)	950 ml
Dung dịch urê (B.9.2)	50 ml

B.9.3.2 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 47 °C đến 50 °C.

Phân phối các lượng 10 ml môi trường hoàn chỉnh vào trong các ống vô trùng (6.12).

Đặt nghiêng ống nghiệm.

Bảo quản các ống môi trường đã rót không bị khô ở 5 °C (6.8) đến bốn tuần.

B.10 Môi trường L-Lyzin đã khử nhóm cacboxyl (LDC)**B.10.1 Thành phần**

L-Lyzin monohydroclorua	5,0 g
Chất chiết nấm men	3,0 g
Glucose	1,0 g
Bromocresol đỏ tia	0,015 g
Nước	1 000 ml

B.10.2 Chuẩn bị

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

Sau khi khử trùng, chỉnh pH đến $6,8 \pm 0,2$ ở 25 °C, nếu cần.

Chuyển các lượng từ 2 ml đến 5 ml môi trường vào các ống cấy hẹp (6.12) có nắp vặn.

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

Bảo quản các ống môi trường đã rót ở 5 °C (6.8) đến ba tháng.

B.11 Thuốc thử β -galactosidase (tùy chọn)

Cho toluen vào các thuốc thử được quy định dưới đây để thực hiện phép thử β -galactosidase.

B.11.1 Dung dịch đệm**B.11.1.1 Thành phần**

Natri dihydro phosphat (NaH_2PO_4)	6,9 g
Natri hydroxit, dung dịch 10 mol/l	khoảng 3 ml
Nước, để có thể tích cuối	50 ml

B.11.1.2 Chuẩn bị

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

Sử dụng dung dịch natri hydroxit để chỉnh pH đến $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C .

Thêm nước để có thể tích cuối là 50 ml.

Bảo quản dung dịch đệm trong bình đậy kín ở 5°C (6.8) đến sáu tháng.

B.11.2 Dung dịch ONPG**B.11.2.1 Thành phần**

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

B.11.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan ONPG trong nước ở khoảng 50°C .

Làm nguội dung dịch.

B.11.3 Thuốc thử hoàn chỉnh**B.11.3.1 Thành phần**

Dung dịch đệm (B.11.1)	5 ml
Dung dịch ONPG (B.11.2)	15 ml

B.11.3.2 Chuẩn bị

Cho dung dịch đệm vào dung dịch ONPG.

Bảo quản thuốc thử hoàn chỉnh trong bình đậy kín (6.12) ở 5°C (6.8) đến ba tháng. Loại bỏ ngay thuốc thử nếu bị chuyển sang màu vàng.

B.12 Môi trường và thuốc thử dùng cho phản ứng indol (tùy chọn)**B.12.1 Môi trường trypton/tryptophan****B.12.1.1 Thành phần**

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

B.12.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước đun sôi.

Chỉnh pH, nếu cần, sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,5 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Phân phối các lượng 5 ml môi trường vào các ống nghiệm (6.12).

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

Bảo quản các ống môi trường đã rót ở $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6.8) đến ba tháng.

B.12.2 Thuốc thử Kovacs**B.12.2.1 Thành phần**

4-Dimethylaminobenzaldehyd	5 g
Axit clohydric, $\rho = 1,18\text{ g/ml}$ đến $1,19\text{ g/ml}$	25 ml
2-Metyl-2-butanol	75 ml

B.12.2.2 Chuẩn bị

Trộn đều các thành phần trên.

Bảo quản thuốc thử hoàn chỉnh trong các bình đầy kín (6.12), nơi tối ở $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6.8) đến sáu tháng.

B.13 Dung dịch nước muối**B.13.1 Thành phần**

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

B.13.2 Chuẩn bị

Hoà tan natri clorua trong nước.

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

Phân phối các lượng dung dịch vào trong các bình hoặc các ống (6.12) có dung tích thích hợp để chứa được các lượng mẫu thử cần thiết cho phép thử.

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

Bảo quản dung dịch này trong các bình/ống đậy kín ở $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6.8) đến sáu tháng.

B.14 Kháng huyết thanh

Một số typ 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 huyết thanh "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 kháng huyết thanh H đơn giá hoặc đa giá).

B.15 Thử hiệu năng để đảm bảo chất lượng môi trường nuôi cấy

Định nghĩa về độ chọn lọc và năng suất được quy định trong TCVN 8128 (ISO 11133). Nhìn chung, cần tuân thủ các quy trình thử nghiệm hiệu năng trong TCVN 8128 (ISO 11133). Đối với thử nghiệm hiệu năng môi trường lỏng chọn lọc và thạch MSR/V, sử dụng cùng một thể tích dịch cấy quy định trong 9.3.2. Đối với thạch MSR/V thì dịch cấy cần chứa 10^3 cfu đến 10^4 cfu để xác định năng suất và từ 10^4 cfu đến 10^6 cfu để xác định độ chọn lọc [xem TCVN 8128 (ISO 11133)]. Đối với các môi trường khác, các mức dịch cấy đối với các sinh vật đích và không phải đích được quy định trong 5.4 của TCVN 8128:2015 (ISO 11133:2014).

Bảng B.1 – Thử nghiệm hiệu năng để đảm bảo chất lượng môi trường nuôi cấy

Môi trường	Chức năng thử nghiệm	Ù	Chủng kiểm chứng	Số WDCM ^a	Chuẩn cứ ^b	
BPW	Năng suất	18 h ± 2 h/ từ 34 °C đến 38 °C	<i>Salmonella</i> Typhimurium ^{c,d} <i>Salmonella</i> Enteritidis ^{c,d}	00031 00030	Độ đục (1-2)	
Canh thang MKTTn	Năng suất	24 h ± 3 h/ 37°C ± 1 °C	<i>Salmonella</i> Typhimurium ^{c,d} <i>Salmonella</i> Enteritidis ^{c,d} + <i>Escherichia coli</i> ^d + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00031 00030 00012 hoặc 00013 00025	>10 khuẩn lạc đặc trưng trên thạch XLD hoặc môi trường được chọn khác	
	Độ chọn lọc		<i>Escherichia coli</i> ^d	00012 hoặc 00013		Ức chế từng phần ≤100 khuẩn lạc trên TSA
			<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087	<10 khuẩn lạc trên TSA	
Canh thang RVS	Năng suất	24 h ± 3 h/ 41,5 °C ± 1 °C	<i>Salmonella</i> Typhimurium ^{c,d} <i>Salmonella</i> Enteritidis ^{c,d} + <i>Escherichia coli</i> ^d + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00031 00030 00012 hoặc 00013 00025	>10 khuẩn lạc đặc trưng trên thạch XLD hoặc môi trường được chọn khác	
	Độ chọn lọc		<i>Escherichia coli</i> ^d	00012 hoặc 00013		Ức chế từng phần <100 khuẩn lạc trên TSA
			<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087	<10 khuẩn lạc trên TSA	
Thạch MSR/V	Năng suất	2×(24 h ± 3 h)/ 41,5 °C ± 1 °C	<i>Salmonella</i> Typhimurium ^{c,d} <i>Salmonella</i> Enteritidis ^{c,d}	00031 00030	Xám trắng, vùng đục lan rộng ra khỏi giọt được cấy. Sau 24 h đến 48 h vùng đục lan ra khắp đĩa (hầu hết). Có thể có thêm: các khuẩn lạc đặc trưng sau khi cấy truyền trên thạch XLD	
	Độ chọn lọc		<i>Escherichia coli</i> ^d	00012 hoặc 00013		Khả năng phát triển tại giọt cấy mà không có vùng đục
			<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087		Không phát triển
Thạch XLD	Năng suất	24 h ± 3 h/ 37 °C ± 1 °C	<i>Salmonella</i> Typhimurium ^{c,d} <i>Salmonella</i> Enteritidis ^{c,d}	00031 00030	Các khuẩn lạc phát triển tốt (2) có tâm màu đen và vùng màu đỏ trong suốt đo làm môi trường đổi màu	
	Độ chọn lọc		<i>Escherichia coli</i> ^d	00012 hoặc 00013		Phát triển hoặc ức chế từng phần (0-1) của các khuẩn lạc màu vàng
			<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087		Ức chế hoàn toàn (0)
Thạch dinh dưỡng	Năng suất	24 h ± 3 h/ từ 34 °C đến 38 °C	<i>Salmonella</i> Typhimurium ^{c,d} <i>Salmonella</i> Enteritidis ^{c,d}	00031 00030	Phát triển tốt	

^a Liên quan đến chủng đối chứng xem tại www.wfoc.info đối với thông tin về số lượng bộ sưu tập chủng cấy và các chi tiết liên hệ; WDCM: World data Centre for Microorganisms.

^b Đánh giá mức độ phát triển như sau: 0: không phát triển; 1: phát triển kém (ức chế từng phần); 2: phát triển tốt [(xem TCVN 8128 (ISO 11133)].

^c Một số hướng dẫn quốc gia có thể yêu cầu sử dụng các serovar khác. Xem các yêu cầu cụ thể liên quan đến việc chọn các *Salmonella* serovar.

^d Tùy chọn chủng, sử dụng tối thiểu một chủng.

Phụ lục C

(tham khảo)

Nghiên cứu đánh giá xác nhận phương pháp và các đặc tính hiệu năng

C.1 Đặc tính hiệu năng của canh thang RVS và canh thang MKTTn

Các nghiên cứu cộng tác quốc tế được tổ chức năm 2000 trong khuôn khổ dự án của châu Âu SMT CT 96 2098 (xem Tài liệu tham khảo [8] và [15]). Các nghiên cứu 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 các mức nhiễm thấp và cao cùng với kiểm chứng âm tính.

Phương pháp đã sử dụng trong nghiên cứu liên phòng là ISO 6579:2002 (xem Tài liệu tham khảo [1]), bao gồm cả tăng sinh chọn lọc trong canh thang RVS và canh thang MKTTn. Quy trình phát hiện *Salmonella* trong các mẫu thực phẩm quy định trong ISO 6579:2002 là tương đương với quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

Các giá trị về các đặc tính hiệu 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 ra khỏi tính toán chỉ vì các lý do kỹ thuật (các sai lệch so với thủ tục quy định).

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

Thông số	Mẫu phomat tươi (mẫu trắng)	Mẫu phomat tươi (nhiễm ở mức thấp) ^a	Mẫu phomat tươi (nhiễm ở mức cao) ^a
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	23	23	23
Số lượng mẫu trong một phòng thử nghiệm	5	5	5
Số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi đánh giá dữ liệu	21	21	21
Số lượng mẫu được giữ lại sau khi đánh giá dữ liệu	105	105	105
Cỡ phân mẫu thử, g	25	25	25
Độ đặc hiệu, %	100	–	–
Độ độ nhạy, %	–	74,3	83,8
LOD ₅₀ (khoảng tin cậy 95 %), cfu/phần mẫu thử	–	5,7 (từ 4,0 đến 8,1)	
^a Các mẫu phomat nhiễm nhân tạo <i>Salmonella</i> Montevideo (chủng dương tính lactose). Các kết quả số có xác suất lớn nhất (MPN) của các mẫu nhiễm nhân tạo như sau:			
	MPN/25 g		
Mức thấp	0,7 (từ 0,2 đến 2,4)		
Mức cao	37,2 (từ 7,5 đến 95,0)		

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

Thông số	Thử nghiệm I bột trứng khô (mẫu trắng)	Thử nghiệm I bột trứng khô (nhiễm ở mức thấp) ^a	Thử nghiệm I bột trứng khô (nhiễm ở mức cao) ^a	Thử nghiệm II bột trứng khô nhiễm ở mức thấp) ^a
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	26	26	26	9
Số lượng mẫu trong một phòng thử nghiệm	5	5	5	5
Số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi đánh giá dữ liệu	21	21	21	8
Số lượng mẫu được giữ lại sau khi đánh giá dữ liệu	105	105	104	40
Cỡ phần mẫu thử, g	25	25	25	25
Độ đặc hiệu, %	100	–	–	nd
Độ nhạy, %	–	98,1	99	nd
LOD ₅₀ (khoảng tin cậy 95 %), cfu/phần mẫu thử	–	6,0 (từ 4,7 đến 7,7)		
nd là không xác định				
^a các mẫu bột trứng nhiễm nhân tạo <i>Salmonella</i> Panama.				
Các kết quả số có xác suất lớn nhất (MPN) của các mẫu nhiễm nhân tạo như sau:				
	MPN/25 g			
Phép thử I mức thấp	9,6 (từ 2,2 đến 26)			
Phép thử I mức cao	115 (từ 22,5 đến 495)			
Phép thử II mức thấp	0,7 (từ 0,2 đến 2,3).			

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

Thông số	Thử nghiệm I thịt gia cầm nguyên liệu (mẫu trắng)	Thử nghiệm I thịt gia cầm nguyên liệu (nhiễm ở mức thấp) ^a	Thử nghiệm I thịt gia cầm nguyên liệu (nhiễm ở mức cao) ^a	Thử nghiệm II thịt gia cầm nguyên liệu (nhiễm ở mức thấp) ^a	Thử nghiệm II thịt gia cầm nguyên liệu (nhiễm ở mức cao) ^a
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	25	25	25	13	13
Số lượng mẫu trong một phòng thử nghiệm	5	5	5	6	6
Số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi đánh giá dữ liệu	20	20	20	13	13
Số lượng mẫu được giữ lại sau khi đánh giá dữ liệu	100	99	100	78	78
Cỡ phần mẫu thử, g	25	25	25	25	25
Độ đặc hiệu, %	100	–	–	nd	nd
Độ nhạy, %	–	98	100	nd	nd
LOD ₅₀ (khoảng tin cậy 95 %), cfu/phần mẫu thử	–	nd	nd	2,2 (từ 1,5 đến 3,2)	
nd là không xác định					
^a Các mẫu thịt gia cầm nhiễm nhân tạo <i>Salmonella</i> Typhimurium trong Phép thử I và nhiễm tự nhiên <i>Salmonella</i> spp. trong phép thử II					
Các kết quả số có xác suất lớn nhất (MPN) của các mẫu nhiễm như sau:					
	MPN/25 g				
Phép thử I mức thấp	3,7 (từ 1 đến 9,5)				
Phép thử I mức cao	5,8 (từ 1 đến 25)				
Phép thử II mức thấp	0,2 (từ 0,04 đến 0,9)				
Phép thử II mức cao	1,0 (từ 2,2 đến 4,5).				

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

Thông số	Vật liệu chuẩn (viên nang chứa khoảng 5 cfu <i>S. Typhimurium</i>)
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 được giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	25
Số lượng các mẫu được chấp nhận	125
Độ đặc hiệu, %	–
Độ nhạy, %	94,4

C.2 Đặc tính hiệu năng của thạch MSRV để phát hiện *Salmonella* spp. trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi

Trong năm 2003, một nghiên cứu đánh giá xác nhận theo ISO 16140:2003^[9] đã được thực hiện (xem Tài liệu tham khảo [9]) để so sánh độ hồi, chỉ sử dụng thạch MSRV với phương pháp quy định trong ISO 6579:2002^[1] (sử dụng môi trường tăng sinh chọn lọc, canh thang RVS và canh thang MKTTn). Kết quả so sánh của nghiên cứu này được tóm tắt trong các Bảng C.5 và Bảng C.6. Một nghiên cứu so sánh liên phòng thử nghiệm cũng đã được thực hiện, trong đó các kết quả được tóm tắt dưới Bảng C.5 và Bảng C.6.

Bảng C.5 - Số lượng mẫu được kiểm tra trong nghiên cứu so sánh phương pháp về đánh giá xác nhận thạch MSRV

Loại thực phẩm	Dương tính			Âm tính	Tổng số
	n.c.	a.c.	Tổng số		
Thịt và sản phẩm thịt	26	13	39	40	79
Sản phẩm sữa	13	18	31	36	67
Cá, hải sản và rau	4	28	32	32	64
Sản phẩm trứng, bột nhào	3	29	32	34	66
Mẫu môi trường	0	30	30	31	61
Tổng số	46	118	164	173	337
n.c. là nhiễm tự nhiên; a.c là nhiễm nhân tạo					

Bảng C.6 – Các kết quả nghiên cứu so sánh phương pháp về đánh giá xác nhận thạch MSR/V

Loại thực phẩm	AC (%)	SP (%)	SE (%)
Thịt và sản phẩm thịt	96	98	95
Sản phẩm sữa	100	100	100
Cá, hải sản và rau	95	94	97
Sản phẩm trứng	98	100	97
Mẫu môi trường	98	100	97
Tất cả các mẫu	98	98	97

AC là độ chính xác tương đối; SP là độ đặc hiệu tương đối; SE là độ nhạy tương đối.

Các kết quả khác của nghiên cứu so sánh phương pháp như sau:

- tám kết quả sai lệch (năm sai lệch âm và ba sai lệch dương), không đáng kể;
- mức phát hiện tương đối đối với năm nền mẫu là từ 0,49 đến 0,78 tế bào *Salmonella* trên 25 g hoặc 25 ml;
- thử nghiệm chọn lọc dương được thử nghiệm trên 55 mẫu thực phẩm phân lập *Salmonella* (10 cfu/ml đến 90 cfu/ml trong BPW);
- thử nghiệm chọn lọc âm được thử nghiệm trên 48 chủng không phải *Salmonella* ảnh hưởng bởi các phương pháp phát hiện *Salmonella* (từ 10^4 cfu/ml đến 10^6 cfu/ml trong BPW);
- nghiên cứu các kết quả thử nghiệm chọn lọc dương/âm cho thấy độ đặc hiệu của phương pháp. Ba chủng *Salmonella* không phát hiện được (2x *S. Paratyphi A*, 1x *S. Enteritidis*) và hai chủng *Enterobacter cloacae* cho các kết quả dương tính giả định.

Kết quả nghiên cứu so sánh liên phòng như sau:

- 29 phòng thử nghiệm tham gia từ 10 quốc gia khác nhau;
- mỗi phòng thử nghiệm đã kiểm tra 24 mẫu sữa bột gầy bị nhiễm nhân tạo ở ba mức nhiễm khác nhau (0 cfu/25 g, 10 cfu/25 g, 30 cfu/25 g). Tám mẫu lặp lại cho mỗi mức nhiễm đã được kiểm tra;
- thử nghiệm lặp lại hai lần với thạch MSR/V và ISO 6579:2002^[1];
- 240 kết quả trên mỗi phương pháp;
- không có ngoại lệ;
- đối với tất cả các mức nhiễm: AC, SE, SP: 100 %, và khoảng tin cậy: 98 %;
- hai kết quả dương tính giả, có thể là do nhiễm chéo.

C.3 Đặc tính hiệu năng của thạch MSR/V để phát hiện *Salmonella* spp. trong phân động vật và trong các mẫu môi trường từ giai đoạn sản xuất ban đầu

Dữ liệu độ chụm của thạch MSR/V để phát hiện *Salmonella* spp. trong phân động vật và trong các mẫu môi trường từ giai đoạn sản xuất ban đầu đã được tính từ ba nghiên cứu liên phòng khác nhau do EURL-*Salmonella*, RIVM, Hà Lan tổ chức. Các nghiên cứu liên quan này được tổ chức trong năm 2008^[16], 2012^[17] và 2013^[21]. Các mẫu đã được thử nghiệm trong ba nghiên cứu này lần lượt là phân gà, phân lợn và bọ ếch. Các mẫu này đã được kiểm tra ở hai mức nhiễm khác nhau, cộng với kiểm chứng âm tính. Tất cả các nghiên cứu này được Ủy ban châu Âu tài trợ.

Phương pháp dùng cho các nghiên cứu liên phòng là ISO 6579:2002/Amd 1:2007^[12] để phát hiện *Salmonella* trong các mẫu từ giai đoạn sản xuất ban đầu bao gồm tăng sinh chọn lọc trên thạch MSR/V. Phương pháp này đã được bao gồm trong tiêu chuẩn này.

Các giá trị đặc tính hiệu năng đã thu được từ các nghiên cứu liên phòng cho mỗi loại mẫu nêu trong các Bảng C.7 đến Bảng C.9. Dữ liệu thu được bởi một số phòng thử nghiệm cộng tác đã bị loại ra khỏi phép tính chỉ dựa trên các lý do kỹ thuật được xác định rõ (lệch với quy định).

Bảng C.7 – Kết quả phân tích dữ liệu thu được với mẫu phân gà

Thông số	Phân gà +				
	Mẫu trắng	STM5 ^a	STM44 ^a	SE7 ^a	SE91 ^a
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	32	32	32	32	32
Số lượng mẫu trên một phòng thử nghiệm	5	5	5	5	5
Số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi đánh giá dữ liệu	19	19	19	19	19
Số lượng mẫu được giữ lại sau khi đánh giá dữ liệu	95	95	95	95	95
Cỡ mẫu thử, g	10	10	10	10	10
Độ đặc hiệu, %	100	–	–	–	–
Độ nhạy cho mỗi serovar và mỗi mức, %	–	96,8	100	67,4	100
LOD ₅₀ của mỗi serovar (khoảng tin cậy 95 %), cfu/phần mẫu thử	–	1,0 (từ 0,7 đến 1,4)		4,3 (từ 3,3 đến 5,6)	
LOD ₅₀ của tất cả (khoảng tin cậy 95 %), cfu/phần mẫu thử	–	2,5 (từ 2,1 đến 3,0)			
^a Các mẫu phân gà nhiễm nhân tạo bằng vật liệu chuẩn với các chủng và các mức sau đây: <i>Salmonella</i> Typhimurium (STM) ở mức 5 cfu/phần mẫu thử và mức 44 cfu/phần mẫu thử; <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) ở mức 7 cfu/phần mẫu thử và mức 91 cfu/phần mẫu thử					

Bảng C.8 – Các kết quả phân tích dữ liệu thu được từ các mẫu phân lộn

Thông số	Phân lộn +				
	Mẫu trắng	SD6 ^a	SD37 ^a	STM10 ^a	STM58 ^a
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	33	33	33	33	33
Số lượng mẫu trên một phòng thử nghiệm	5	5	5	5	5
Số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi đánh giá dữ liệu	26	26	26	26	26
Số lượng mẫu được giữ lại sau khi đánh giá dữ liệu	130	130	130	130	130
Cỡ mẫu thử, g	25	25	25	25	25
Độ đặc hiệu, %	99,2	–	–	–	–
Độ nhạy cho mỗi serovar và mỗi mức, %	–	88,5	97,7	91,5	98,5
LOD ₅₀ của mỗi serovar (khoảng tin cậy 95 %), cfu/phần mẫu thử	–	2,8 (từ 2,2 đến 3,5)		3,8 (từ 3,0 đến 4,7)	
LOD ₅₀ của tất cả (khoảng tin cậy 95 %), cfu/phần mẫu thử	–	3,2 (từ 2,8 đến 3,8)			

^a Các mẫu phân lộn nhiễm nhân tạo bằng vật liệu chuẩn với các chủng và các mức sau đây:
Salmonella Derby (SD) ở mức 6 cfu/phần mẫu thử và mức 37 cfu/phần mẫu thử;
Salmonella Typhimurium (STM) ở mức 10 cfu/phần mẫu thử và mức 58 cfu/phần mẫu thử

Bảng C.9 – Các kết quả phân tích dữ liệu thu được trên mẫu túi bọc ủng

Thông số	Túi bọc ủng		
	+10 g vật liệu môi trường trên ổ gà dè +		
	Mẫu trắng	STM9 ^a	STM81 ^a
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	36	36	36
Số lượng mẫu trên một phòng thử nghiệm	8	8	8
Số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi đánh giá dữ liệu	33	33	33
Số lượng mẫu được giữ lại sau khi đánh giá dữ liệu	264	264	264
Cỡ phần mẫu thử	Túi bọc ủng	Túi bọc ủng	
Độ đặc hiệu, %	99,6	–	–
Độ nhạy cho mỗi mức, %	–	94,7	98,1
LOD ₅₀ (khoảng tin cậy 95 %), cfu/mẫu thử	–	3,8 (từ 3,2 đến 4,4)	

^a Các mẫu túi bọc ủng nhiễm nhân tạo bằng dịch cấy pha loãng của *Salmonella* Typhimurium (STM) ở mức 9 cfu/mẫu thử và mức 81 cfu/mẫu thử

Phụ lục D

(quy định)

Phát hiện các *Salmonella enterica* phân loài serovar Typhi và serovar Paratyphi

D.1 Yêu cầu chung

Một số serovar của *Salmonella* không phát hiện được bằng phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này. Phụ lục này đưa ra các bước bổ sung cần thực hiện khi cần phát hiện các *Salmonella enterica* phân loài serovar Typhi và serovar Paratyphi. Cần thực hiện đầy đủ phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Các chủng của serovar Gallinarum (các biovar gallinarum và pullorum) không ảnh hưởng đến sức khoẻ con người và do đó trong tiêu chuẩn này không đề cập đến việc phân lập chúng (xem Tài liệu tham khảo [12]). Tuy nhiên, nếu các biovar này cần được tìm thì có thể sử dụng môi trường Selenit Cystin (SC) bổ sung cho canh thang RVS và canh thang MKTTn như mô tả trong phụ lục này.

D.2 Phát hiện *Salmonella* Typhi và *Salmonella* Paratyphi

D.2.1 Nguyên tắc

CẢNH BÁO – *Salmonella* Typhi và *Salmonella* Paratyphi là các vi sinh vật thuộc mối nguy nhóm 3. Cần sử dụng các trang thiết bị thích hợp khi xử lý các chủng này.

D.2.1.1 Yêu cầu chung

Xem 4.1.

D.2.1.2 Tăng sinh sơ bộ trong môi trường lỏng không chọn lọc

Xem 4.2.

D.2.1.3 Tăng sinh trong môi trường lỏng chọn lọc

Xem 4.3. Cây dịch thu được trong 4.2 vào môi trường selenit cystin (SC) bổ sung cho việc nuôi cấy trong canh thang RVS và canh thang MKTTn.

Môi trường SC được ủ ở 37 °C (6.3) trong 24 h và 48 h.

D.2.1.4 Nuôi cấy trên thạch chọn lọc và nhận biết

Xem (4.4). Cây dịch thu được trong 4.3 và D.2.1.3 vào thạch Bismuth sulphit (BS) bổ sung cho thạch XLD.

Thạch BS được ủ ở 37 °C (6.3) và kiểm tra sau 24 h và sau 48 h, nếu cần.

D.2.1.5 Khẳng định việc nhận biết

Xem 4.5.

D.3 Môi trường nuôi cấy**D.3.1 Môi trường Selenit Cystin (SC)**

CẢNH BÁO - Natri hydro selenit có thể gây quái thai và có thể gây hại cho thai nhi. Cần phải có các biện pháp phòng ngừa thích hợp khi chuẩn bị và xử lý môi trường này.

D.3.1.1 Môi trường cơ bản

Pepton ^a	5,0 g
Lactose	4,0 g
Dinatri hydro phosphat ngậm 12 phân tử nước ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	10,0 g
Natri hydro selenit	4,0 g
Nước	1 000 ml

^a Ví dụ: Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym.

D.3.1.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan natri hydro selenit trong nước, sau đó thêm các thành phần còn lại. Đun đến sôi để hòa tan.

D.3.1.2 Dung dịch L-Cystin**D.3.1.2.1 Thành phần**

L-Cystin	0,1g
Dung dịch natri hydroxid, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$	15 ml
Nước vô trùng	Khoảng 85 ml

D.3.1.2.2 Chuẩn bị

Cho các thành phần trên vào bình định mức 100 ml (D.4.2) vô trùng. Pha loãng với nước vô trùng đến vạch. Không khử trùng.

D.3.1.3 Môi trường hoàn chỉnh**D.3.1.3.1 Thành phần**

Môi trường cơ bản (D.3.1.1)	1 000 ml
Dung dịch L-Cystin (D.3.1.2)	100 ml

D.3.1.3.2 Chuẩn bị

Bằng kỹ thuật vô trùng, cho dung dịch L-Cystin vào môi trường cơ bản. Chính pH, sao cho pH cuối cùng là $7,0 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần. Phân phối môi trường một cách vô trùng vào ống hoặc bình vô trùng (6.12) để đạt được độ sâu ít nhất 5 cm. Khử trùng bằng hơi nước trong 15 min. Không hấp áp lực.

Bảo quản các ống môi trường đã rót ở $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6.8). Nếu xuất hiện kết tủa màu đỏ thì loại bỏ môi trường.

D.3.2 Thạch Bismuth Sulfit (BS)**D.3.2.1 Thành phần**

Sản phẩm thủy phân các mô động vật bằng enzym	10,0 g
Chất chiết thịt	5,0 g
Dextrose	5,0 g
Dinatri hydro phosphat (khan) (Na_2HPO_4)	4,0 g
Sắt (II) sulfat (khan)	0,3 g
Bismuth sulfit (chỉ thị)	8,0 g
Xanh brilliant	0,025 g
Thạch	20,0 g
Nước	1 000 g

D.3.2.2 Chuẩn bị

Cho các thành phần trên vào nước và gia nhiệt có khuấy đến sôi. Tiếp tục đun sôi nhẹ trong 30 s đến 60 s để hòa tan thạch và thu được huyền phù đồng nhất (chất kết tủa không tan). Làm nguội đến khoảng từ $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, sau đó khuấy nhẹ để tạo huyền phù phần kết tủa.

Chính pH, sao cho pH là $7,7 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần.

Rót 20 ml đến 25 ml huyền phù vào đĩa Petri (6.14) và để cho đông đặc. Các đĩa đã chuẩn bị đúng cách sẽ có màu vàng rơm nhạt đục và mượt như kem.

Chuẩn bị các đĩa này một ngày trước khi sử dụng và bảo quản nơi tối ở nhiệt độ môi trường.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô đĩa thạch, nếu cần. Không làm quá khô.

D.3.3 Thử nghiệm hiệu năng

Định nghĩa về độ chọn lọc và năng suất được quy định trong TCVN 8128 (ISO 11133). Thử nghiệm cấy phải giống như thử nghiệm cấy được sử dụng trong phương pháp mà môi trường có chứa số lượng sinh vật đích hoặc không phải đích quy định trong 5.4 của TCVN 8128:2015 (ISO 11133:2014).

Bảng D.1 – Thử nghiệm hiệu năng về đảm bảo chất lượng môi trường nuôi cấy

Môi trường	Chức năng thử nghiệm	Ủ	Chủng kiểm chứng	Số WDCM ^a	Tiêu chí ^e
Selenit Cystin	NĂNG SUẤT	24 h ± 3 h/ 37 °C ± 1 °C	<i>Salmonella</i> Typhimurium ^{c,d}	00031	>10 khuẩn lạc đặc trung trên thạch XLD hoặc môi trường được chọn khác
			<i>Salmonella</i> Enteritidis ^{c,d} + <i>Escherichia coli</i> ^d	00030 00012 hoặc 00013	
	+ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		00025		
	ĐỘ CHỌN LỌC		<i>Escherichia coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	Ức chế một phần ≤100 khuẩn lạc trên TSA
			<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087	<10 khuẩn lạc trên TSA
Thạch Bismuth sulfit	NĂNG SUẤT	2×(24 h + 3 h)/ 37 °C ± 1 °C	<i>Salmonella</i> Typhimurium ^{c,d}	00031	Phát triển tốt (2) các khuẩn lạc màu nâu, xám hoặc đen, thường có ánh kim loại sau 24 h và chuyển màu đen đều sau 48 h
	<i>Salmonella</i> Enteritidis ^{c,d}		00030		
	ĐỘ CHỌN LỌC/ ĐỘ ĐẶC HIỆU		<i>Escherichia coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	Phát triển hoặc ức chế một phần (từ 0 đến 1) các khuẩn lạc màu xanh lá cây hoặc nâu không có ánh kim loại
	ĐỘ CHỌN LỌC		<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087	Ức chế hoàn toàn (0)

^a Liên quan đến chủng đối chứng xem tại w.w.w.fccc.info đối với thông tin về số lượng bộ sưu tập chủng cấy và các chi tiết liên hệ; WDCM: World data Centre for Microorganisms.

^b Sử dụng tối thiểu một chủng.

^c Một số hướng dẫn khác có thể yêu cầu sử dụng các serovar khác. Xem các yêu cầu cụ thể liên quan đến việc chọn các *Salmonella* serovar.

^d Tùy chọn chủng được chọn tự do, tối thiểu sử dụng một chủng.

^e Sự phát triển được phân như sau: 0: không phát triển; 1: phát triển kém (ức chế từng phần); 2: phát triển tốt [(xem TCVN 8128 (ISO 11133)].

D.4 Thiết bị và dụng cụ

D.4.1 Yêu cầu chung

Ngoài các thiết bị và dụng cụ nêu trong Điều 6, sử dụng các thiết bị và dụng cụ sau:

D.4.2 Bình định mức, vô trùng, dung tích danh định 100 ml.

D.5 Cách tiến hành

D.5.1 Yêu cầu chung

Ngoài quy trình quy định trong Điều 9, bổ sung các bước sau.

D.5.2 Tăng sinh trong môi trường lỏng chọn lọc

Chuyển 1 ml dịch nuôi cấy trong 9.2 vào ống có chứa 10 ml môi trường SC (D.3.1).

Ủ môi trường nuôi cấy SC ở 37 °C (6.3) trong 24 h ± 3 h và 48 h ± 3 h.

D.5.3 Nuôi cấy trên môi trường thạch chọn lọc

D.5.3.1 Sau khi ủ 24 h ± 3 h và 48 h ± 3 h sử dụng dịch cấy thu được trong canh thang SC (D.5.2), dùng que cấy vòng (6.10) để cấy từ phần một phần ba canh thang phía trên lên bề mặt đĩa thạch XLD (B.6) để thu được các khuẩn lạc riêng rẽ.

D.5.3.2 Tiến hành theo cách tương tự với thạch BS (D.3.2) sử dụng một que cấy vòng vô trùng như trên.

D.5.3.3 Ủ các đĩa thạch XLD và BS ở 37 °C (6.3) trong 24 h ± 3 h.

D.5.3.4 Sau khi ủ 24 h ± 3 h ở 37 °C (6.3), kiểm tra các đĩa thạch BS về sự có mặt của các khuẩn lạc *Salmonella* điển hình có màu đen, xám, hoặc nâu có hoặc không có ánh kim loại. Ban đầu môi trường xung quanh thường có màu nâu sau đó chuyển sang màu đen khi tăng thời gian ủ. Đánh dấu vị trí của các khuẩn lạc này dưới đáy đĩa. Nếu có mặt các khuẩn lạc điển hình thì chọn năm khuẩn lạc để khẳng định.

Ủ lại các đĩa thạch BS thêm 24 h (tổng 48 h ± 3 h) và kiểm tra lại các khuẩn lạc điển hình hoặc không điển hình có màu xanh lá cây hơi đen hoặc không có màu đen.

D.5.3.5 Sau khi ủ 24 h ± 3 h ở 37 °C, kiểm tra các đĩa thạch XLD như mô tả trong 9.4.2. Các khuẩn lạc điển hình có tâm màu đen và vùng màu đỏ trong suốt do sự đổi màu của chất chỉ thị. Các biến thể

Salmonella âm tính H₂S như *Salmonella* Paratyphi A có màu hồng với tâm màu hồng đậm hơn. Đánh dấu vị trí của chúng dưới đáy đĩa.

Nếu không phát hiện được các khuẩn lạc điển hình hoặc không điển hình thì ủ lại các đĩa thêm 24 h ở 37 °C (6.3) (tổng 48 h ± 3 h) và kiểm tra lại.

CHÚ THÍCH: Không phải tất cả các môi trường thạch có màu có thể giúp cho việc phục hồi *Salmonella* Typhi và *Salmonella* Paratyphi.

D.6 Khẳng định

D.6.1 Yêu cầu chung

Xem 9.5.

D.6.2 Diễn giải các phép thử sinh hóa

Salmonella Typhi và *Salmonella* Paratyphi thường cho thấy các phản ứng được đưa ra trong Bảng 1.

Phụ lục E

(tham khảo)

Ví dụ về các môi trường nuôi cấy đĩa thạch chọn lọc

CHÚ THÍCH 1: Thông tin được lấy từ Tài liệu tham khảo [20] với sự cho phép của Hiệp hội Hóa học Hoàng gia, Cambridge, Vương quốc Anh.

CHÚ THÍCH 2: Danh mục các môi trường nuôi cấy đĩa thạch chọn lọc vẫn chưa đầy đủ.

Bảng E.1 – Thuốc thử chọn lọc (g/l) được sử dụng trong một số môi trường thạch chọn lọc dùng để phân lập *Salmonella* spp.

Môi trường	Mật	Bismuth sulfit	Xanh brilliant	Cefsulodin	Ferric amoni xitrat III	Natri xitrat	Natri desoxycholat	Novobioxin	Tergitol 4	Natri thiosulfat
ABC ^a			0,012 5 + 0,005		0,5	8,5	5,0			
BGA										
BS		8,0 ^b	0,016 + 0,025							
BSA TM (OSCM II) ^{c,*}				0,012				0,005		
CHROMagar TM <i>Salmonella</i> ¹	2						2,5	0,01		
CHROMagar TM <i>Salmonella</i> Plus ¹							1,5	0,15	1,5	
CSE						0,5		0,07		
DCLS						10,5	2,5			5,0
DCA					1,0	6,0	3,0			5,4
HE	9,0				1,5					5,0
MLCB			0,012 5		1,0					4,0
MM					0,8				4,5 ml	6,8
Önöz ¹	3,825		0,001 66		0,5	9,3				4,25
Thạch Rambach TM										
chromID [®] <i>Salmonella</i> (SMID2) ⁹	1,5		0,000 3							
SS	8,5		0,000 33		1,0	8,5				8,5
XLD					0,8		1,0			6,8
XLT4					0,8				4,6 ml	6,8
IBISA ^{6g}							2,5	0,02		
ASAP ^{6p}				0,025			5			
IRIS <i>Salmonella</i> ^{6h}				0,010		7,0				
Rapid ¹ <i>Salmonella</i> ¹				0,010		5,0				

^a ABC: uji-Môi trường sinh màu; BGA: Thạch xanh brilliant; BS:Thạch Bismuth Sulfit; BSA: Thạch *Salmonella* brillianceTM (thường được gọi là OSCM II:Môi trường sinh màu *Salmonella* oxid II); CSE: Estease *Salmonella* sinh màu¹⁰⁰; DCLS: Thạch Desoxycholat Xitrat Lactose; DCA: Thạch Desoxycholat Xitrat (lịch chọn lọc); HE: Thạch Hektoen Enteric; MLCB: Thạch xanh brilliant tinh thể lim lysin mannitol; MM: Thạch Miller Malinson¹¹⁰; chromID[®] *Salmonella* (còn gọi là SMID2: Môi trường nhận biết *Salmonella* II); SS: Thạch *Salmonella* Shigella; XLD: Thạch Deoxycholat Lysin Xylose; XLT4: Thạch Xylose Lysin Tergitol 4.

^b Natri sulfit:6,15 g/l và bismuth amoni xitrat:1,85 g/l.

^c BSA cũng chứa InhibigenTM để ức chế chọn lọc sự phát triển của *Escherichia coli*.

Thông tin dưới đây đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương:

^d LABM là ví dụ về sản phẩm thích hợp của nhà cung cấp môi trường ABC.

^e BSATM là tên thương mại sản phẩm thích hợp có bán sẵn được cung cấp bởi Oxoid.

^f Merck là ví dụ về nhà cung cấp thích hợp môi trường Önöz.

^g chromID[®] *Salmonella* là tên thương mại sản phẩm thích hợp có bán sẵn được cung cấp bởi bioMérieux.

^h IRIS *Salmonella*[®] là tên thương mại sản phẩm thích hợp có bán sẵn được cung cấp bởi SOLABIA S.A.S và Các chận đoán BIODAR.

ⁱ Biodar là ví dụ về nhà cung cấp thích hợp Rapid¹ *Salmonella*.

^j CHROMagarTM *Salmonella*. CHROMagarTM *Salmonella* Plus, Thạch RambachTM là tên thương mại sản phẩm thích hợp có bán sẵn được cung cấp bởi CHROMagar.

Bảng E.2 – Hệ thống thuốc thử chỉ thị được sử dụng trong một số môi trường thạch chọn lọc dùng để phân lập *Salmonella* spp. Các thuốc thử này chỉ thị cho các phản ứng xảy ra ở hầu hết các chủng *Salmonella*. Giữa các dấu ngoặc là nồng độ của các thuốc thử liên quan được tính bằng g/l

Môi trường	α -galactosidase dương tính	β -galactosidase âm tính	β -glucosidase âm tính	Esterase dương tính	Cellobiose âm tính	H ₂ S dương tính	Lactose âm tính	Lysin decarboxylase dương tính ^b	Mannitol dương tính	Propylen glycol dương tính	Salicin âm tính	Sucrose âm tính	Trehalose dương tính	Xylose dương tính
ABC ^c	X	X												
BGA							X (10)					X (10)		
BS						X								
BSA TM (OSCM II) ^d			X	X										
CHROMAgar TM <i>Salmonella</i>		X	X	X										
CHROMAgar TM <i>Salmonella</i> Plus ^f			X	X										
CSE				X			X (14,6)							
DCLS							X (5,0)					X (5,0)		
DCA						X	X (10,0)							
HE						X	X (12,0)				X (2,0)	X (12,0)		
MLCB						X		X (5,0)	X (3,0)					
MM		X			X (5,0)	X	X (10,0)		X (1,2)				X (1,33)	
Ônôz ^g						X	X (11,5)					X (13,0)		
Thạch Rambach TM chromID [®] <i>Salmonella</i> (SMID2) ^f		X	X	X			X (6,0)			X (10,5)				
SS						X	X (10,0)							
XLD						X	X (7,5)	X (5,0)				X (7,5)		X (3,75)
XLT4						X	X (7,5)	X (5,0)				X (7,5)		X (3,75)
ASAP TM			X	X										
IBISA TM			X	X										
IRIS <i>Salmonella</i> ^{®g}														
Rapid <i>Salmonella</i>														

^a ABC: α -Môi trường sinh màu (www.labm.com); BGA: Thạch xanh brilliant; BS: Thạch Bismuth Sulfite; BSA: Thạch *Salmonella* brillianceTM (thường được gọi là OSCM II: Môi trường sinh màu *Salmonella* oxid; www.oxid.com); CSE: Esterase *Salmonella* sinh màu¹⁰⁰; DCLS: Thạch Desoxycholat Xitrat Lactose; DCA: Thạch Desoxycholat Xitrat (thạch Lelison); HE: Thạch Hektoen Enteric; MLCB: Thạch xanh brilliant tinh thể tím lysin mannitol; MM: Thạch Miller Mallinson¹⁰⁰; SMID2: Môi trường nhận biết *Salmonella* II (còn gọi là chromiD[®] *Salmonella*; www.biomerieux.com); SS: Thạch *Salmonella* Shigella; XLD: Thạch Deoxycholat Lysin Xylose; XLT4: Thạch Xylose Lysin Tergitol 4.

^b Thuốc thử là L-Lysin hydrochlorua.

Thông tin dưới đây đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

^c LABM là ví dụ về nhà cung cấp thích hợp môi trường ABC.

^d BSATM là tên thương mại sản phẩm thích hợp có bán sẵn được cung cấp bởi Oxoid.

^e Merck là ví dụ về nhà cung cấp thích hợp môi trường Ônôz.

^f chromiD[®] *Salmonella* là tên thương mại sản phẩm thích hợp có bán sẵn được cung cấp bởi bioMérieux.

^g IRIS *Salmonella*[®] là tên thương mại sản phẩm thích hợp có bán sẵn được cung cấp bởi SOLABIA S.A.S và Các chẩn đoán BIOKAR

^h Biorad là ví dụ về sản phẩm thích hợp của nhà cung cấp Rapid *Salmonella*.

ⁱ CHROMagarTM *Salmonella*, CHROMagarTM *Salmonella* Plus, Thạch RambachTM là tên thương mại sản phẩm thích hợp có bán sẵn được cung cấp bởi CHROMagar.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 4829:2005 (ISO 6579:2002, Cor 1:2004) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện Salmonella trên đĩa thạch.*
- [2] Sửa đổi 1:2008 TCVN 4829:2005 (ISO 6579:2002, Amd. 1:2007) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện Salmonella spp. trên đĩa thạch – Sửa đổi 1: Phụ lục D: Phát hiện Salmonella spp. trong phân động vật và trong mẫu môi trường từ giai đoạn sản xuất ban đầu*
- [3] TCVN 10780-2 (ISO/TS 6579-2) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện, định lượng và xác định kiểu huyết thanh của Salmonella – Phần 2: Định lượng bằng kỹ thuật số đếm có xác suất lớn nhất được thu nhỏ*
- [4] TCVN 6402:2007 (ISO 6785:2001) *Sữa và sản phẩm sữa – Phát hiện Salmonella*
- [5] ISO 16140:2003, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods*
- [6] ISO 16140-1, *Microbiology of the food chain – Method validation – Part 1: Vocabulary*
- [7] ISO 16140-2, *Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.*
- [8] AFSSA, 2001. *Evaluation of microbiological methods for detection and for enumeration of microbiological contaminants in food. Final report Contract SMT4/CT96 2098. Coordination by Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. AFSSA, France, February 2001*
- [9] S. Colombo, J. Crociani, H. Horry *ISO16140 validation of the MSRV method for Salmonella spp. Detection in food and environ-mental samples.* Poster at IAFP, Rome, 2007
- [10] V.M. Cooke, R.J. Miles, R.G. Price, A.C. Richardson *A novel chromogenic ester agar medium for detection of salmonellae. Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65 pp. 807–812
- [11] CULTURE MEDIA FOR FOOD MICROBIOLOGY In: *Progress in Industrial Microbiology.* (J.E.L. Corry, G.D.W. Curtis, R.M. Baird eds.). Elsevier, Amsterdam, Vol. 34, 1995
- [12] J.M. Smedt De, R.F. Bolderdijk, H. Rappold, D. Lautenschlaeger *Rapid Salmonella detection in foods by motility enrichment on a modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium. J. Food Prot.* 1986, 49 (7) pp. 510–514
- [13] W.H. Ewing *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae.* Elsevier Science publishing Co., Inc, New York, Fourth Edition, 1986
- [14] M.M. Ewing, W.H. and Ball, *The biochemical reactions of the genus Salmonella.* National Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, 1996
- [15] P.Feldsine *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

- [16] A.F.A. Kuijpers, C. Veenman, K.A. Mooijman *EU Interlaboratory comparison study Veterinary-XI*, 2008. *Bacteriological detection of Salmonella in chicken faeces*. National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands. RIVM Report no.: 330604 011/ 2008. Available at: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/330604011.pdf> (visited 2016-12-14)
- [17] A.F.A. Kuijpers, K.A. Mooijman 2013. *EU Interlaboratory comparison study Veterinary-XV (2012) - Detection of Salmonella in pig faeces*. National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands. RIVM Report no.: 330604 028/ 2013. Available at: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/330604028.pdf> (visited 2016-12-14)
- [18] E.T. Mallinson, R.G. Miller, C.E. de Rezende, K.E. Ferris, J. deGrafr-Hanson, S.W. Joseph *Improved plating media for the detection of Salmonella species with typical and atypical hydrogen sulfide production*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000, 12 pp. 83–87
- [19] MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES FOR TERRESTRIAL ANIMALS 2009 (OIE Terrestrial Manual) Chapter 2.3.11 Fowl Typhoid and Pullorum Disease, pp. 538–48. Available at: <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/> (visited 2016-12-14)
- [20] K.A. Mooijman Culture media for the isolation of *Salmonella*. In: Handbook of Culture media for Food and Water Microbiology, (J.E.L. Corry, G.D.W. Curtis, R.M. Baird eds.). Third Edition, 2012
- [21] A.F.A. Kuijpers, K.A. Mooijman *EU Interlaboratory comparison study primary production-XVI (2013) - Detection of Salmonella in chicken faeces adhering to boot socks*. National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands. RIVM Report no.: 330604 031/2014. Available at: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/330604031.pdf> (visited 2016-12-14)
- [22] O.A. Soutourina, E.A. Semenova, V.V. Parfenova, A. Danchin, P. Bertin Control of bacterial motility by environmental factors in polarly flagellated and peritrichous bacteria isolated from Lake Baikal. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67 (9) pp. 3852–3859
- [23] C. Veenman, H. Korver, K.A. Mooijman *Improvements in the method for detection of Salmonella spp. in animal faeces*. National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands. RIVM report 330300 010, 2007. Available at: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/330300010.pdf> (visited 2016-12-14)
- [24] TCVN 10780-3 (ISO/TR 6579-3) *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp phát hiện, định lượng và xác định typ huyết thanh của Salmonella – Phần 3: Hướng dẫn xác định typ huyết thanh của Salmonella spp.*
- [25] TCVN 8129 (ISO 18593) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp lấy mẫu bề mặt sử dụng đĩa tiếp xúc và lau bề mặt*
- [26] TCVN 11923 (ISO/TS 17728) *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Kỹ thuật lấy mẫu để phân tích vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi*
- [27] TCVN 6400 (ISO 707) *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
- [28] TCVN 10782 (ISO 13307) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Giai đoạn sản xuất ban đầu – Kỹ thuật lấy mẫu*

- [29] TCVN 7925 (ISO 17604) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp lấy mẫu thân thịt tươi để phân tích vi sinh vật*
- [30] D'AOUST J.Y., MAISHMENT C., BRUGENER D.M., CONLEY D.R., LOIT A., MILLING M. AND PURVIS U. Detection of *Salmonella* in refrigerated preenrichment and enrichment broth cultures. *J. Food Prot.* 1980, 43 (5) pp. 343–345
- [31] D'AOUST J.Y., BECKERS H.J., BOOTHROYD M., MATES A., MCKEE C.R., MORAN A.B., SADO P., SPAIN G.E., SPERBER W.H., VASSILIADIS P., WAGNER D.E. AND WIBERG C. ICMSF methods studies. XIV. Comparative study on recovery of *Salmonella* from refrigerated preenrichment and enrichment broth cultures. *J. Food Prot.* 1983, 46 (5) pp. 391–399
- [32] BECKERS H.J., van LEUSDEN F.M. AND PETERS R. Het effect van koelen van bebroede voorophopings- en selectieve ophopingsbouillon op de isolatie van *Salmonella*. (in Dutch). *De Ware(n). Chemicus.* 1984, 14 pp. 75–80
- [33] DAVIES R.H. BEDFORD S. AND SHANKSTER S. Enhanced culture techniques for the detection of *Salmonella*. *Vet. Rec.* 2001, pp. 539–540
- [34] COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR SALMONELLA. Newsletter 2008, Vol. 14, no. 2, page 8. Available at: <http://www.eurlsalmonella.eu/dsresource?type=pdf&disposition=inline&objectid=rivmp:181223&versionid=&subobjectname> (visited 2016-12-14)
- [35] H. Becker, S. Eberhardt, E. Märtlbauer Comparative studies on the detection of *Salmonellae* in milk and milk products using a horizontal (ISO 6579:2002) and a vertical (ISO 6785/IDF 93:2001) International Standard. *Arch. Lebensmittelhyg.* 2003, 54 pp. 118–121
- [36] European Union Reference Laboratory for *Salmonella*. Newsletter 2015, Vol. 21, no. 4, page 4. Available at: <http://www.eurlsalmonella.eu/dsresource?type=pdf&disposition=inline&objectid=rivmp:299850&versionid=&subobjectname=> (visited 2016-12-14)
- [37] ISO 17468, *Microbiology of the food chain – Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method*
- [38] ISO 6887-1:2017, *Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*
-