

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 11039-5:2015

Xuất bản lần 1

**PHỤ GIA THỰC PHẨM -
PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH VI SINH VẬT -
PHẦN 5: PHÁT HIỆN SALMONELLA**

*Food additive - Microbiological analyses -
Part 5: Detection of salmonella*

HÀ NỘI - 2015

Lời nói đầu

TCVN 11039-5:2015 được xây dựng trên cơ sở tham khảo JECFA 2006, *Combined compendium of food additive specifications, Volume 4: Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications*;

TCVN 11039-5:2015 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F4 Gia vị và phụ gia thực phẩm biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố;

Bộ tiêu chuẩn TCVN 11039 Phụ gia thực phẩm – Phương pháp phân tích vi sinh vật gồm các phần sau:

- TCVN 11039-1:2015, Phần 1: Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí bằng kỹ thuật đếm đĩa;
- TCVN 11039-2:2015, Phần 2: Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí bằng kỹ thuật đếm đĩa xoắn;
- TCVN 11039-3:2015, Phần 3: Phát hiện và định lượng coliform và *E. coli* bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (Phương pháp chuẩn);
- TCVN 11039-4:2015, Phần 4: Phát hiện và định lượng coliform và *E. coli* bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (Phương pháp thông dụng);
- TCVN 11039-5:2015, Phần 5: Phát hiện *Salmonella*;
- TCVN 11039-6:2015, Phần 6: Phát hiện và định lượng *Staphylococcus aureus* bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc;
- TCVN 11039-7:2015, Phần 7: Phát hiện và định lượng *Staphylococcus aureus* bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN);
- TCVN 11039-8:2015, Phần 8: Định lượng nấm men và nấm mốc.

Phụ gia thực phẩm - Phương pháp phân tích vi sinh vật - Phần 5: Phát hiện *Salmonella*

*Food additives - Microbiological analyses -
Part 5: Detection of Salmonella*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện *Salmonella* trong phụ gia thực phẩm.

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.

AOAC 967.28 *Salmonella* in foods. Serological tests (*Salmonella* trong thực phẩm. Phép thử huyết thanh)

AOAC 978.24 *Salmonella* spp. in foods. Biochemical identification kit method (*Salmonella* spp. trong thực phẩm. Phương pháp nhận diện bằng kit sinh hóa)

AOAC 989.12 *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other Enterobacteriaceae in foods. Biochemical identification kit method (*Salmonella* spp., *Escherichia coli* và các vi khuẩn Enterobacteriaceae khác trong thực phẩm. Phương pháp nhận diện bằng kit sinh hóa)

AOAC 991.13 *Salmonella*, *Escherichia coli*, and other Enterobacteriaceae in foods. Biochemical system identification (Vitek GNI+) screening method [*Salmonella*, *Escherichia coli* và các vi khuẩn Enterobacteriaceae khác trong thực phẩm. Phương pháp sàng lọc nhận diện bằng hệ sinh hóa (Vitek GNI+)]

AOAC 994.04 *Salmonella* in dry foods. Refrigerated pre-enrichment and selective enrichment broth culture methods (*Salmonella* trong thực phẩm dạng khô. Phương pháp sử dụng tiền tăng sinh lạnh đông và canh thang tăng sinh chọn lọc)

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Salmonella (*Salmonella*)

Các vi sinh vật hình thành khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc không 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 Nguyên tắc

Quy trình phát hiện *Salmonella* cần qua bốn giai đoạn kế tiếp nhau:

- a) Tăng sinh sơ bộ trong môi trường lỏng không chọn lọc (canh thang lactose hoặc môi trường thích hợp khác), ủ 24 h ± 2 h ở 35 °C.
- b) Tăng sinh trong môi trường lỏng chọn lọc (môi trường Tetrathionat, môi trường Rappaport-Vassiliadis hoặc môi trường thích hợp khác), với nhiệt độ và thời gian thích hợp.
- c) Đổ đĩa và nhận dạng: cấy dịch tăng sinh thu được lên các môi trường đặc chọn lọc (thạch BS, thạch XLD và thạch HE) với nhiệt độ và thời gian thích hợp.
- d) Khẳng định *Salmonella* bằng các phép thử sinh hoá và huyết thanh thích hợp (xem 8.5).

4 Môi trường cấy, dịch pha loãng và thuốc thử

- 4.1 Canh thang lactose (xem A.1).
- 4.2 Canh thang selenit cystin (SC) (xem A.2).
- 4.3 Canh thang tetrathionat (TT) (xem A.3).
- 4.4 Môi trường Rappaport-Vassiliadis (RV) (xem A.4).
- 4.5 Thạch xylose lysin desoxycholat (XLD) (xem A.5).
- 4.6 Thạch Hektoen enteric (HE) (xem A.6).
- 4.7 Thạch bismuth sulfit (BS) (xem A.7).
- 4.8 Thạch sắt ba đường (TSI) (xem A.8).
- 4.9 Thạch lysin sắt (LIA) (Edwards và Fife) (xem A.9).

- 4.10 Canh thang trypton (tryptophan) (xem A.10).
- 4.11 Canh thang trypticase đậu tương-tryptose (xem A.11).
- 4.12 Canh thang MR-VP (xem A.12).
- 4.13 Thạch xitrat Simmons (xem A.13).
- 4.14 Canh thang ure (xem A.14).
- 4.15 Canh thang ure (chuẩn bị nhanh) (xem A.15).
- 4.16 Canh thang malonat (xem A.16).
- 4.17 Canh thang lysin decarboxylase (xem A.17).
- 4.18 Môi trường thử nghiệm tính di động (bán đặc) (xem A.18).
- 4.19 Canh thang kali xyanua (KCN) (xem A.19).
- 4.20 Canh thang cacbohydrat phenol đỏ (xem A.20).
- 4.21 Canh thang cacbohydrat đỏ tía (xem A.21).
- 4.22 Thạch MacConkey (xem A.22).
- 4.23 Canh thang dịch tim não (BHI) (xem A.23).
- 4.24 Thạch máu tryptose cơ bản (xem A.24).
- 4.25 Dung dịch papain, 5 % (khối lượng) (xem A.25).
- 4.26 Thuốc thử Kovacs (xem A.26).
- 4.27 Các thuốc thử Voges-Proskauer (VP) (xem A.27).
- 4.28 Creatin phosphat tinh thể
- 4.29 Dung dịch kali hydroxit, 40 % (khối lượng) (xem A.28).
- 4.30 Dung dịch thuốc nhuộm bromcresol đỏ tía, 0,2 %
- 4.31 Chỉ thị metyl đỏ (xem A.31).
- 4.32 Dung dịch natri clorua (NaCl), 5 % (khối lượng/thể tích).
- 4.33 Nước muối sinh lý, 0,85 % (khối lượng/thể tích) (vỏ trùng) (xem A.29).

4.34 Nước muối sinh lý formalin (xem A.30).

4.35 Dung dịch mannan endo-1,4- betamannosidase (EC 3.2.178), 1,0 % (khối lượng/thể tích)

Thêm 1 g mannosidase vào 99 ml nước cất vô trùng.

4.36 Kháng huyết thanh *Salmonella* đa giá (O)

4.37 Kháng huyết thanh *Salmonella* đa giá (H)

4.38 Các kháng huyết thanh *Salmonella* đơn giá nhóm (O): A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, E₁, E₂, E₃, E₄, F, G, H, I, Vi, và các nhóm thích hợp khác

4.39 Các kháng huyết thanh *Salmonella* Spicer-Edwards (H)

4.40 Nước cất vô trùng

5 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 của phòng thử nghiệm vi sinh và cụ thể là:

5.1 Máy đồng hóa.

5.2 Bình trộn vô trùng.

5.3 Bình nón nắp xoáy, miệng rộng, dung tích 500 ml.

5.4 Bình nón, dung tích 500 ml, vô trùng.

5.5 Cốc có mỏ, dung tích 250 ml, vô trùng.

5.6 Phễu giấy hoặc phễu thủy tinh vô trùng, có cỡ phù hợp.

5.7 Bộ dàn mẫu, bằng chất dẻo hoặc thủy tinh được uốn một đầu, vô trùng.

5.8 Cân và quả cân, có thể cân đến 2000 g, có độ nhạy 0,1 g.

5.9 Cân và quả cân, có thể cân đến 120 g, có độ nhạy 5 mg.

5.10 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.11 Tủ ấm, có chế độ làm lạnh hoặc tủ lạnh phòng thử nghiệm, có thể duy trì nhiệt độ $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- 5.12 Nồi cách thủy, kiểm soát được nhiệt độ ở $49\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.13 Nồi cách thủy, tuần hoàn, kiểm soát được nhiệt độ ở $43\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.14 Nồi cách thủy, tuần hoàn, kiểm soát được nhiệt độ ở $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.15 Thìa hoặc dụng cụ thích hợp khác để chuyển các mẫu phụ gia thực phẩm, vô trùng.
- 5.16 Đĩa cấy, vô trùng, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo, kích thước 15 mm x 100 mm.
- 5.17 Pipet vô trùng, có thể phân phối 1 ml, chia vạch đến 0,01 ml; có thể phân phối 5 ml và 10 ml, chia vạch 0,1 ml.
- 5.18 Kim cấy và vòng cấy (đường kính trong khoảng 3 mm), nicrom, platin-iridi, dây cromel hoặc chất dẻo vô trùng.
- 5.19 Ống nghiệm hoặc ống cấy vô trùng, kích thước 16 mm x 150 mm và 20 mm x 150 mm; ống huyết thanh, kích thước 10 mm x 75 mm hoặc 13 mm x 100 mm.
- 5.20 Máy trộn Vortex.
- 5.21 Kéo, dao, kẹp, vô trùng.
- 5.22 Đèn (để quan sát phản ứng huyết thanh học).
- 5.23 Đèn Fisher hoặc Bunsen (đèn có đầu đốt sử dụng ga) hoặc đèn cồn.
- 5.24 Giấy thử pH, có dải pH từ 6 đến 8, chia vạch 0,4 đơn vị pH trên mỗi dải màu.
- 5.25 Máy đo pH.

6 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn cụ thể có liên quan đến sản phẩm. Nếu chưa có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm thì các bên có liên quan nên thoả thuận với nhau về vấn đề này.

7 Chuẩn bị mẫu thử

Mẫu được trộn đều để thu được các phần mẫu thử đồng nhất.

8 Cách tiến hành

8.1 Tăng sinh sơ bộ

Cân vô trùng 25 g mẫu, cho vào bình nắp vận miệng rộng vô trùng dung tích 500 ml (5.3) hoặc vật chứa thích hợp khác. Thêm 225 ml canh thang lactose vô trùng (4.1) và trộn đều, chuẩn bị về cơ bản theo tỉ lệ mẫu : canh thang = 1 : 9 (thể tích). Vận chặt nút bình và để yên 60 min \pm 5 min ở nhiệt độ phòng. Trộn kỹ bằng cách xoay và xác định pH bằng giấy thử (5.24). Chỉnh pH nếu cần, đến $6,8 \pm 0,2$. Nới lỏng nắp bình khoảng 1/4 vòng và ủ 24 h \pm 2 h ở 35 °C trong tủ ẩm (5.10).

Trong một số trường hợp đặc biệt, việc phân tích mẫu có thể bị cản trở bởi độ nhớt của các chất làm dày. Có thể bổ sung các bước xử lý như sau:

- Đối với gum ghatti, bổ sung natri clorua 5 % (4.32) (nồng độ cuối cùng là 0,1 %) vào môi trường tăng sinh sơ bộ canh thang lactose, chỉnh pH đến 6,5.
- Đối với phân tích gelatin, thêm 5 ml dung dịch 5 % papain (4.25) (nồng độ cuối cùng là 0,1 %) vào môi trường tăng sinh sơ bộ canh thang lactose, trộn kỹ. Vận chặt nút bình và ủ ở 35 °C trong tủ ẩm (5.10) trong 60 min \pm 5 min. Trộn bằng cách xoay và chỉnh pH đến 6,8, nếu cần. Nới lỏng bình khoảng 1/4 vòng và ủ 24 h \pm 2 h ở 35 °C trong tủ ẩm (5.10).
- Đối với carob bean gum và guar gum, cân vô trùng 25 g mẫu cho vào cốc có mở vô trùng dung tích 250 ml (5.5) hoặc vật chứa thích hợp khác. Chuẩn bị dung dịch mannan endo-1,4-betamannosidase 1,0 % (4.35). Phân phối vào các chai 150 ml. Dung dịch có thể bảo quản được ở 2 °C đến 5 °C trong 2 tuần. Thêm 225 ml canh thang lactose vô trùng và 2,25 ml dung dịch mannosidase 1 % vô trùng vào bình nắp xoáy miệng rộng 500 ml (5.3) hoặc vật chứa thích hợp. Khuấy mạnh canh thang mannosidase/lactose bằng que khuấy từ, đồng thời đổ nhanh 25 g mẫu thử qua phễu thủy tinh vô trùng (5.6) vào canh thang mannosidase/lactose. Vận chặt nút bình và để yên 60 min \pm 5 min ở nhiệt độ phòng. Nới lỏng bình và ủ 24 h \pm 2 h ở 35 °C trong tủ ẩm (5.10) mà không điều chỉnh pH.

8.2 Tăng sinh chọn lọc

8.2.1 Đối với gum carob bean và gum guar

Chuyển 1 ml dịch cấy đã tăng sinh sơ bộ (xem 8.1) vào 10 ml canh thang SC (4.2) và 1 ml dịch cấy đã tăng sinh sơ bộ khác vào 10 ml canh thang TT (4.3). Trộn bằng máy Vortex (5.20). Ủ canh thang SC và canh thang TT trong 24 h \pm 2 h ở 35 °C trong tủ ẩm (5.10). Tiến hành theo 8.2.2 b.

8.2.2 Đối với các mẫu khác

Chuyển 0,1 ml dịch cấy đã tăng sinh sơ bộ (xem 8.1) vào 10 ml môi trường RV (4.4) và 1 ml dịch cấy đã tăng sinh sơ bộ khác vào 10 ml canh thang TT (4.3). Trộn bằng máy Vortex (5.20).

b) Ủ các môi trường tăng sinh chọn lọc như sau:

– Mật độ vi sinh vật cao: Ủ môi trường RV trong 24 h \pm 2 h ở 42 °C \pm 0,2 °C trong nồi cách thủy tuần hoàn có kiểm soát nhiệt (5.14); ủ canh thang TT trong 24 h \pm 2 h ở 43 °C \pm 0,2 °C trong nồi cách thủy tuần hoàn có kiểm soát nhiệt (5.13).

– Mật độ vi sinh vật thấp (ngoại trừ gum carob bean và gum guar): Ủ môi trường RV trong 24 h \pm 2 h ở 42 °C \pm 0,2 °C (nồi cách thủy tuần hoàn có kiểm soát nhiệt) (5.14); ủ canh thang TT trong 24 h \pm 2 h ở 35 °C \pm 2,0 °C trong tủ ấm (5.10).

c) Trộn (vortex, nếu là ống) và cấy rìa vòng cấy 3 mm (5.18) 10 μ l canh thang TT đã ủ lên thạch BS (4.7) (chuẩn bị các đĩa BS một ngày trước khi cấy rìa và bảo quản nơi tối ở nhiệt độ phòng), thạch XLD (4.5) và thạch HE (4.6).

d) Cấy lặp lại với vòng cấy 3 mm (10 μ l) canh thang SC (đối với guar gum) hoặc môi trường RV (đối với các nền mẫu khác).

e) Đối với các tủy chọn về tăng sinh sơ bộ mẫu đã ủ được làm lạnh và tăng sinh chọn lọc mẫu đã ủ (riêng đối với các canh thang SC và TT) của thực phẩm có độ ẩm thấp, xem AOAC 994.04.

f) Ủ các đĩa trong 24 h \pm 2 h ở 35 °C trong tủ ấm (5.10).

g) Kiểm tra các đĩa về sự có mặt của các khuẩn lạc có thể là *Salmonella*.

8.3 Sàng lọc khuẩn lạc

Kiểm tra các đĩa (xem 8.2) như sau:

a) Hình thái khuẩn lạc *Salmonella* điển hình

– Thạch HE: khuẩn lạc có màu xanh (từ lục lam đến lam), có hoặc không có tâm đen. Nhiều chủng cấy *Salmonella* có thể cho khuẩn lạc có tâm lớn, màu đen bóng hoặc có thể xuất hiện dưới dạng khuẩn lạc đen gần như hoàn toàn. Số ít loài *Salmonella* sinh khuẩn lạc màu vàng, có hoặc không có tâm màu đen, nhưng không đặc trưng.

– Thạch BS: khuẩn lạc *Salmonella* điển hình có thể có màu nâu, xám hoặc đen, đôi khi có ánh kim loại. Xung quanh môi trường thường ban đầu có màu nâu, sau một thời gian ủ chuyển màu đen, tạo thành quầng. Một số chủng có thể cho các khuẩn lạc màu xanh lá, môi trường xung quanh hơi sẫm màu hoặc không.

– Thạch XLD: các khuẩn lạc màu hồng có hoặc không có tâm màu đen. Nhiều chủng cấy *Salmonella* cho các khuẩn lạc có tâm lớn màu đen, bóng hoặc có thể cho khuẩn lạc gần như đen hoàn toàn. Số ít loài *Salmonella* không điển hình sinh khuẩn lạc màu vàng, có hoặc không có tâm màu đen.

TCVN 11039-5:2015

b) Hình thái khuẩn lạc *Salmonella* không điển hình

Khi không thấy có khuẩn lạc điển hình hoặc nghi ngờ là *Salmonella*, tìm các khuẩn lạc *Salmonella* không điển hình như sau:

- Thạch HE và thạch XLD: Số ít chủng cấy *Salmonella* không điển hình sinh khuẩn lạc màu vàng, có hoặc không có tâm màu đen trên thạch HE và thạch XLD. Khi không có khuẩn lạc *Salmonella* điển hình trên thạch HE và thạch XLD sau khi ủ 24 h ± 2 h thì chọn hai hoặc nhiều khuẩn lạc *Salmonella* không điển hình.
- Thạch BS: Một vài chủng không điển hình sinh các khuẩn lạc màu xanh lá, môi trường xung quanh sẫm màu hoặc không. Nếu không xuất hiện các khuẩn lạc điển hình hoặc nghi ngờ trên thạch BS sau 24 h ± 2 h thì không chọn khuẩn lạc mà ủ lại thêm 24 h ± 2 h. Nếu không xuất hiện các khuẩn lạc điển hình hoặc nghi ngờ sau khi ủ 48 h ± 2 h thì chọn hai hoặc nhiều khuẩn lạc không điển hình.

c) Chủng cấy kiểm chứng được khuyến cáo sử dụng

Cùng với các chủng cấy kiểm chứng dương tính (*Salmonella* điển hình), ba chủng cấy *Salmonella* được khuyến cáo sử dụng khi lựa chọn hình thái khuẩn lạc *Salmonella* không điển hình trên các môi trường thạch chọn lọc. Các chủng cấy này là *S. diarizonae* (ATCC 12325) dương tính với lactose, dương tính với hydro sulfua (H₂S) và *S. abortus equi* (ATCC 9842) âm tính với lactose, âm tính với hydro sulfua; hoặc *S. diarizonae* (ATCC 29934) dương tính với lactose, âm tính với hydro sulfua.

CHÚ THÍCH: Các chủng cấy này có thể lấy từ Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

8.4 Cấy chuyển sang thạch nghiêng

a) Chọn hai hoặc nhiều hơn các khuẩn lạc điển hình hoặc nghi ngờ là *Salmonella* từ mỗi loại thạch chọn lọc (xem 8.3). Cấy vào thạch TSI (4.8) và thạch LIA (4.9). Nếu các đĩa thạch BS không có khuẩn lạc *Salmonella* điển hình hoặc nghi ngờ hoặc không thấy có khuẩn lạc mọc thì ủ thêm 24 h. Dùng que cấy vô trùng chạm nhẹ vào chính giữa khuẩn lạc được chọn và ria cấy lên mặt nghiêng thạch TSI, sau đó đâm sâu xuống đáy. Không cần khử trùng que cấy, cấy luôn vào thạch LIA bằng cách đâm sâu xuống đáy thạch hai lần và sau đó ria lên mặt nghiêng. Do phản ứng decarboxyl hóa lysin là yếm khí bắt buộc nên thạch nghiêng LIA phải có phần chân cao 4 cm. Bảo quản các đĩa thạch chọn lọc đã chọn ở nhiệt độ từ 5 °C đến 8 °C.

b) Ủ thạch nghiêng TSI và LIA ở 35 °C trong 24 h ± 2 h. Nới lỏng nắp ống để duy trì điều kiện hiếu khí trong khi ủ, nhằm ngăn ngừa sinh quá nhiều hydro sulfua. *Salmonella* điển hình sinh kiềm (màu đỏ) trên bề mặt nghiêng và sinh axit (màu vàng) khi cấy đâm sâu, có hoặc không sinh hydro sulfua (làm đen thạch) trên thạch TSI. Trên LIA, *Salmonella* điển hình sinh phản ứng kiềm (màu đỏ tía) ở đáy ống. Chỉ duy nhất ống có màu vàng đặc trưng ở đáy mới được coi là phản ứng axit (âm tính). Vì vậy, không loại

bỏ các ống cấy chỉ dựa trên cơ sở thấy nhạt màu. Hầu hết các chủng *Salmonella* sinh hydro sulfua trên LIA. Một số chủng không phải *Salmonella* sinh phản ứng màu đỏ gạch trên mặt nghiêng thạch LIA.

c) Nếu có mặt các khuẩn lạc điển hình trên thạch BS sau khi ủ 24 h \pm 2 h thì chọn hai hoặc nhiều hơn các khuẩn lạc. Tất cả các đĩa thạch BS đã chọn sau 24 h \pm 2 h đều được ủ lại thêm 24 h \pm 2 h. Sau khi ủ 48 h \pm 2 h, chọn hai hoặc nhiều khuẩn lạc điển hình, nếu có, từ các đĩa thạch BS. Chỉ khi các khuẩn lạc đã chọn từ các đĩa thạch BS sau khi ủ 24 h \pm 2 h cho các phản ứng không điển hình trong thạch TSI và LIA thì mới loại bỏ vì đó không phải là *Salmonella*.

d) Tất cả chủng cấy cho phản ứng kiểm ở chân thạch LIA, chưa kể đến phản ứng ở TSI, đều có khả năng là *Salmonella*, cần thử tiếp các phản ứng sinh hóa và huyết thanh. Các chủng cấy cho phản ứng axit ở chân thạch LIA, cho phản ứng kiểm trên mặt nghiêng và phản ứng axit ở chân thạch TSI cũng cần được xem xét khả năng là *Salmonella* và nên thử tiếp các phản ứng sinh hóa và huyết thanh. Các chủng cấy cho phản ứng axit ở chân thạch LIA, cho phản ứng axit trên cả mặt nghiêng và chân thạch TSI không được coi là *Salmonella*. Các chủng giả định dương tính ở TSI đã giữ lại được thử nghiệm như hướng dẫn dưới đây để khẳng định là *Salmonella*, bao gồm cả *S. arizonae*. Nếu trên thạch TSI không thấy phản ứng đặc trưng của *Salmonella* (phản ứng kiểm trên mặt nghiêng và phản ứng axit ở chân thạch) thì chọn thêm các khuẩn lạc nghi ngờ từ đĩa môi trường chọn lọc cấy vào thạch nghiêng TSI và LIA như mô tả ở trên.

e) Áp dụng các phép thử sinh hóa đối với:

– Ba chủng giả định trên thạch TSI chuyển từ dây đĩa ria cấy môi trường RV, nếu có, và ba chủng giả định trên thạch TSI chuyển từ dây đĩa ria cấy môi trường tetrathionat, nếu có.

– Nếu từ một dây các đĩa thạch không phân lập được ba chủng giả định dương tính trên TSI thì phân lập ba chủng giả định dương tính trên TSI từ dây các đĩa thạch khác, nếu được, để thử các phản ứng sinh hóa và huyết thanh. Kiểm tra tối thiểu sáu chủng cấy TSI từ mỗi 25 g phần mẫu thử.

8.5 Thử nghiệm sinh hóa và huyết thanh

8.5.1 Thử nghiệm với chủng chưa cấy thuần

Cấy ria lên thạch TSI (xem 8.4) các khuẩn lạc chưa thuần chủng chọn trên thạch MacConkey (4.22), thạch HE (4.6) hoặc thạch XLD (4.5). Ủ các đĩa 24 h \pm 2 h ở 35 °C trong tủ ấm (5.10). Chọn các khuẩn lạc nghi ngờ là *Salmonella* trên các loại thạch đĩa chọn lọc như sau:

a) Thạch MacConkey: Khuẩn lạc điển hình trong suốt và không màu, đôi khi có tâm màu sẫm. Các khuẩn lạc *Salmonella* sẽ làm trong các vùng kết tủa mặt đôi khi xuất hiện do sự có mặt các vi sinh vật khác.

b) Thạch HE: Xem quy trình nêu trong điểm a của 8.3.

c) Thạch XLD: Xem quy trình nêu trong điểm a của 8.3.

Chuyển ít nhất hai khuẩn lạc nghi ngờ là *Salmonella* vào mặt nghiêng thạch TSI và LIA như mô tả ở trên và tiếp tục như trong 8.4.

8.5.2 Thử nghiệm với chủng cấy thuần

a) Phép thử urease (phép thử thông thường)

Dùng que cấy vô trùng, lấy vi khuẩn trên mặt nghiêng của thạch TSI dương tính giả định (xem 8.4) cấy vào các ống canh thang ure (4.14). Hiếm khi các ống canh thang ure chưa cấy có màu đỏ tía bên (như kết quả dương tính), do đó các ống chưa cấy canh thang này được dùng làm kiểm chứng. Ủ 24 h \pm 2 h ở 35 °C trong tủ ấm (5.10).

b) Phép thử urease tùy chọn (phép thử nhanh)

Chuyển hai vòng cấy 3 mm từ mỗi chủng cấy trên mặt nghiêng thạch TSI dương tính giả định (xem 8.4) vào các ống canh thang ure thử nhanh (4.15). Ủ 2 h ở 37 °C \pm 0,5 °C trong nồi cách thủy. Loại bỏ tất cả chủng cấy cho phản ứng dương tính. Giữ lại để xem xét thêm tất cả chủng cấy cho phản ứng âm tính (không đổi màu môi trường).

8.5.3 Phép thử ngưng kết kháng huyết thanh lông (H) đa giá

a) Thực hiện phép thử ngưng kết kháng huyết thanh đa giá tại điểm này hoặc muộn hơn như mô tả dưới đây. Cấy vi sinh vật phát triển từ mặt nghiêng thạch TSI âm tính urease (xem 8.5.2) vào một trong hai môi trường sau:

- Canh thang dịch tim não (4.23) và ủ từ 4 h đến 6 h ở 35 °C trong tủ ấm (5.10) cho đến khi nhìn bằng mắt thường thấy vi sinh vật phát triển (để thử nghiệm trong cùng ngày); hoặc
- Canh thang trypticase đậu tương-tryptose (4.11) và ủ 24 h \pm 2 h ở 35 °C trong tủ ấm (5.10) (để thử nghiệm trong ngày hôm sau).

Thêm 2,5 ml nước muối sinh lý formalin (4.34) vào 5 ml của mỗi dịch cấy.

b) Từ canh thang formalin, chọn hai chủng cấy và thử với kháng huyết thanh ngưng kết đa giá *Salmonella* (H) (4.37). Cho 0,5 ml kháng huyết thanh ngưng kết đa giá *Salmonella* đã pha loãng thích hợp vào các ống huyết thanh 10 mm x 75 mm hoặc 13 mm x 100 mm (5.19). Thêm 0,5 ml kháng nguyên cần thử. Chuẩn bị nước muối kiểm chứng bằng cách trộn 0,5 ml nước muối sinh lý formalin (4.34) với 0,5 ml kháng nguyên formalin. Ủ các hỗn hợp ở nhiệt độ từ 48 °C đến 50 °C trong nồi cách thủy (5.12). Quan sát sau từng khoảng 15 min và đọc kết quả cuối cùng trong 1 h.

Dương tính: ngưng kết trong ống kháng huyết thanh thử nghiệm nhưng không ngưng kết trong ống kiểm chứng.

Âm tính: không ngưng kết cả trong ống kháng huyết thanh thử nghiệm và ống kiểm chứng.

Không đặc hiệu: ngưng kết cả trong ống kháng huyết thanh thử nghiệm và ống kiểm chứng. Tiếp tục thử nghiệm các chủng cấy cho các kết quả nêu trên với kháng huyết thanh Spicer-Edwards theo 8.5.4.

8.5.4 Phép thử huyết thanh Spicer-Edwards

Sử dụng phép thử này thay thế cho phép thử ngưng kết (H) đa giá (8.5.3). Phép thử này cũng được sử dụng cho các chủng cấy ngưng kết không đặc hiệu trong phép thử ngưng kết kháng huyết thanh (H) đa giá. Thực hiện phép thử kháng huyết thanh ngưng kết Spicer-Edwards (H) (4.39) như mô tả ở trên. Thực hiện các phép thử sinh hóa bổ sung (8.5.6.2) với các chủng cấy cho kết quả thử ngưng kết (H) dương tính như mô tả ở dưới. Nếu cả hai dịch cấy đã formalin hóa đều âm tính thì thực hiện phép thử huyết thanh với bốn chủng bổ sung cấy trong canh thang (như trên). Nếu có thể, thu lấy hai chủng cấy dương tính để thử nghiệm sinh hóa. Nếu các chủng cấy trên TSI âm tính urease mà cho kết quả âm tính trong phép thử ngưng kết huyết thanh (H) thì cũng cần thực hiện các phép thử sinh hóa bổ sung.

8.5.5 Thử nghiệm chất cấy âm tính urease

a) Canh thang lysin decarboxylase

Nếu phép thử LIA đáp ứng thì không cần lặp lại phép thử này.

Sử dụng canh thang lysin decarboxylase (4.17) trong phép xác định cuối cùng của lysin decarboxylase nếu chủng cấy cho phản ứng còn nghi ngờ trên LIA. Cấy vào canh thang một lượng nhỏ vi sinh vật phát triển trên mặt nghiêng của thạch TSI nghi ngờ là *Salmonella* (xem 8.5.2). Vặn chặt nắp và ủ 48 h \pm 2 h ở 35 °C trong tủ ẩm (5.10), kiểm tra sau mỗi 24 h. Các loài *Salmonella* gây phản ứng kiềm làm cho môi trường chuyển màu đỏ tía (phản ứng dương tính). Nếu phép thử âm tính, môi trường chuyển màu vàng. Nếu môi trường bị mất màu (không vàng cũng không đỏ tía) thì thêm vài giọt thuốc nhuộm bromcresol đỏ tía 0,2 % (4.30) và đọc lại phản ứng trong ống.

b) Canh thang phenol đỏ dulcitol hoặc canh thang đỏ tía cơ bản có 0,5 % dulcitol

Ủ canh thang phenol đỏ dulcitol (4.20) hoặc canh thang đỏ tía (4.21) một lượng nhỏ vi sinh vật phát triển trên thạch TSI (xem 8.4). Nới lỏng nắp và ủ 48 h \pm 2 h ở 35 °C trong tủ ẩm (5.10), có kiểm tra sau 24 h. Hầu hết các loài *Salmonella* cho phản ứng dương tính, được chỉ thị bởi việc sinh khí trong ống Durham và pH axit (môi trường chuyển màu vàng). Phép thử âm tính được chỉ thị bởi việc không sinh khí trong ống Durham và màu đỏ (với chất chỉ thị phenol đỏ) hoặc đỏ tía (với chất chỉ thị bromcresol đỏ tía) trên toàn bộ môi trường.

c) Canh thang trypton (hoặc tryptophan)

Cấy vào canh thang trypton (hoặc tryptophan) (4.10) một lượng nhỏ vi sinh vật phát triển trên thạch TSI (xem 8.4). Ủ 24 h \pm 2 h ở 35 °C trong tủ ẩm (5.10) và tiến hành các thử nghiệm sau:

- 1) Khả năng phát triển trong canh thang kali xyanua (4.19): Chuyển một vòng cấy 3 mm (5.18) canh thang tryptophan đã cấy vi khuẩn sau 24 h vào canh thang KCN. Hơ nóng miệng ống sao cho ống được bịt kín khi đầy bằng nút bần phù sáp. Ủ 48 h \pm 2 h ở 35 °C trong tủ ẩm (5.10) kiểm tra sau mỗi 24 h. Vi sinh vật phát triển (làm đục môi trường) được coi là dương tính. Hầu hết các loài *Salmonella* không sinh trưởng trong môi trường này, biểu hiện qua việc không làm đục môi trường.
- 2) Sử dụng canh thang malonat (4.16): Chuyển một vòng cấy 3 mm (5.18) canh thang tryptophan đã cấy vi khuẩn sau 24 h vào canh thang malonat. Hiếm khi các ống canh thang malonat chưa cấy cho màu xanh lam bền (như phép thử dương tính), do đó các ống canh thang chưa cấy này được dùng làm kiểm chứng. Ủ 48 h \pm 2 h ở 35 °C trong tủ ẩm (5.10), kiểm tra sau 24 h. Hầu hết các loài *Salmonella* cho phản ứng âm tính trên canh thang này (màu xanh lá hoặc không đổi màu).
- 3) Phép thử indol: Chuyển 5 ml canh thang tryptophan đã cấy vi khuẩn 24 h vào ống nghiệm. Thêm từ 0,2 ml đến 0,3 ml thuốc thử Kovacs (4.26). Hầu hết các chủng cấy *Salmonella* cho phản ứng âm tính (không có màu đỏ đậm trên bề mặt canh thang). Màu sắc trung gian, sự chuyển màu da cam và hồng không ổn định được báo cáo kết quả là \pm .
- 4) Các phép thử ngưng kết huyết thanh (H) đối với *Salmonella*: Nếu ở trên chưa thực hiện cả phép thử ngưng kết (H) đa giá (8.5.3) và phép thử ngưng kết (H) Spicer-Edwards (8.5.4) thì thực hiện phép thử ở giai đoạn này.
- 5) Loại bỏ tất cả các chủng cấy không phải *Salmonella* vừa dương tính với phép thử indol vừa âm tính với phép thử ngưng kết kháng huyết thanh (H), hoặc vừa dương tính với phép thử KCN vừa âm tính với phép thử lysin decarboxylase.

8.5.6 Phép thử ngưng kết huyết thanh thân (O) đối với *Salmonella*

Chú ý: Kiểm tra trước tất cả kháng huyết thanh *Salmonella* với các chủng cấy đã biết.

8.5.6.1 Phép thử kháng huyết thanh thân (O) đa giá

Dùng chì sáp để đánh dấu hai phần khoảng 1 cm x 2 cm ở hai phía đĩa Petri (15 mm x 100 mm) bằng thủy tinh hoặc chất dẻo (5.16). Có thể sử dụng các lam kính bán sẵn. Nhũ hóa một vòng cấy 3 mm vi khuẩn cấy trên mặt nghiêng thạch TSI đã ủ từ 24 h đến 48 h hoặc tốt nhất là cấy trên thạch máu tryptose cơ bản (chưa bổ sung máu) (4.24) với 2 ml nước muối 0,85 % (4.33). Nhỏ một giọt huyền phù vi khuẩn lên phần trên của mỗi ô hình chữ nhật đã đánh dấu bằng chì sáp. Nhỏ tiếp một giọt nước muối vào phía dưới của một ô và một giọt kháng huyết thanh thân (O) *Salmonella* đa giá (4.36) vào

phần còn lại. Dùng que cấy vô trùng để trộn huyền phù vi khuẩn với nước muối ở ô thứ nhất và lặp lại với ô nhỏ kháng huyết thanh. Chao nghiêng hỗn dịch trong 1 min và quan sát trên nền tối được chiếu sáng tốt. Phân loại kết quả thử ngưng kết kháng huyết thanh thân (O) đa giá như sau:

Dương tính: ngưng kết trong các hỗn dịch thử nghiệm và không ngưng kết trong nước muối kiểm chứng.

Âm tính: không ngưng kết cả trong các hỗn dịch thử nghiệm và nước muối kiểm chứng.

Không đặc hiệu: ngưng kết cả trong hỗn dịch thử nghiệm và mẫu kiểm chứng, cần thực hiện các phép thử huyết thanh và sinh hóa tiếp theo.

8.5.6.2 Thử nghiệm kháng huyết thanh đơn giá nhóm (O)

Thực hiện theo 8.5.6.1, có thể sử dụng các kháng huyết thanh đơn giá nhóm (O), kể cả Vi (4.38) thay cho kháng huyết thanh (O) đa giá. Đối với việc xử lý cụ thể các chủng cấy cho phản ứng ngưng kết Vi dương tính, xem AOAC 967.28B. Các chủng cấy ngưng kết dương tính với các kháng huyết thanh thân (O) đơn giá cũng được báo cáo là dương tính với nhóm (O). Các chủng cấy không ngưng kết với kháng huyết thanh đơn giá được báo cáo là âm tính với nhóm (O).

Xác định các chủng cấy là *Salmonella* với các phản ứng *Salmonella* điển hình từ phép thử số 1 đến 11, trong Bảng 2. Nếu một chủng cấy trên TSI từ 25 g mẫu thử được xác định là *Salmonella* thì không cần thử các chủng cấy trên TSI khác từ cùng một mẫu thử. Nếu chủng cấy được chứng minh là mang kháng nguyên *Salmonella* qua phép thử ngưng kết (H) *Salmonella* dương tính nhưng không có các đặc tính sinh hóa của *Salmonella* thì cần được thuần nhất và thử nghiệm lại.

Bảng 2 – Tổng hợp các phản ứng sinh hóa và huyết thanh của *Salmonella*

Phép thử hoặc cơ chất	Dương tính	Âm tính	Các phản ứng ^{a)}
1. Glucose (TSI)	Chân thạch màu vàng	Chân thạch màu đỏ	+
2. Lysin decarboxylase (LIA)	Chân thạch màu đỏ tía	Chân thạch màu vàng	+
3. Hydro sulfua (TSI và LIA)	Có màu đen	Không có màu đen	+
4. Urease	Màu đỏ tía	Không đổi màu	-
5. Canh thang lysin decarboxylase	Màu đỏ tía	Màu vàng	+
6. Canh thang phenol đỏ dulcitol	Màu vàng và/hoặc sinh khí	Không sinh khí; không đổi màu	+ ^b
7. Canh thang KCN	Vi sinh vật phát triển	Vi sinh vật không phát triển	-
8. Canh thang malonat	Màu xanh lam trên bề mặt	Không đổi màu	- ^c
9. Phép thử indol	Màu đỏ đậm trên bề mặt	Màu vàng trên bề mặt	-

Bảng 2 (kết thúc)

Phép thử hoặc cơ chất	Dương tính	Âm tính	Các phản ứng ^{a)}
10. Phép thử ngưng kết đa giá	Ngưng kết	Không ngưng kết	+
11. Phép thử tế bào đa giá	Ngưng kết	Không ngưng kết	+
12. Canh thang phenol đỏ lactose	Màu vàng và/hoặc sinh khí	Không sinh khí; không đổi màu	- ^c
13. Canh thang phenol đỏ sacarose	Màu vàng và/hoặc sinh khí	Không sinh khí; không đổi màu	-
14. Phép thử Voges-Proskauer	Màu hồng đến đỏ	không đổi màu	-
15. Phép thử metyl đỏ	Màu đỏ phai	Màu vàng phai	+
16. Thạch xitrat Simmons	Vi sinh vật phát triển; màu xanh lam	Vi sinh vật không phát triển; không đổi màu	v

^{a)} (+) là ≥ 90 % dương tính trong 1 ngày hoặc 2 ngày; (-) là ≥ 90 % âm tính trong 1 ngày hoặc 2 ngày; (v) là thay đổi.
^{b)} Phần lớn chủng cây *S. arizonae* âm tính.
^{c)} Phần lớn chủng cây *S. arizonae* dương tính.

8.6 Thử nghiệm khuẩn lạc *Salmonella* không điển hình

Thực hiện các phép thử sinh hóa bổ sung sau đây trên các chủng cây không cho các phản ứng *Salmonella* điển hình đối với phép thử số 1 đến 11 trong Bảng 2, và cũng không được phân loại là *Salmonella* (xem Bảng 3).

a) Canh thang phenol đỏ lactose hoặc canh thang đỏ tía lactose

- Cấy vào canh thang phenol đỏ lactose (4.20) hoặc canh thang đỏ tía lactose (4.21) một lượng nhỏ vi khuẩn phát triển trên mặt nghiêng của thạch TSI từ 14 h đến 48 h. Ủ 48 h ± 2 h ở 35 °C trong tủ ấm (5.10), kiểm tra sau mỗi 24 h. Dương tính: sinh axit (màu vàng) và sinh khí trong ống Durham. Nếu chỉ sinh axit cũng được coi là phản ứng dương tính. Hầu hết các chủng cây *Salmonella* cho kết quả âm tính, được chỉ thị bởi việc không sinh khí trong ống Durham và đổi màu môi trường thành màu đỏ (chất chỉ thị phenol đỏ) hoặc màu đỏ tía (chất chỉ thị bromcresol đỏ tía).
- Loại bỏ các chủng cây không phải *Salmonella* (dương tính với các phép thử lactose), ngoại trừ các chủng cây sinh axit trên mặt nghiêng của TSI và có phản ứng dương tính trong LIA hoặc các chủng cây cho các phản ứng dương tính với canh thang malonat. Thực hiện các phép thử tiếp theo trên các chủng cây để xác định có phải là *S. arizonae*.

b) Canh thang phenol đỏ sacarose (4.20) hoặc canh thang đỏ tia sacarose (4.21)

Thực hiện quy trình như mô tả ở trên. Loại bỏ các chủng cấy không phải *Salmonella* (dương tính với sacarose), trừ các chủng sinh axit trên bề mặt nghiêng của TSI và cho phản ứng dương tính trên LIA.

c) Canh thang MR-VP

Cấy vào môi trường MR-VP (4.12) một lượng nhỏ vi sinh vật phát triển trên mặt nghiêng của TSI chưa được xác định, nghi ngờ có *Salmonella*. Ủ 48 h ± 2 h ở 35 °C trong tủ ấm (5.10).

- 1) Thực hiện phép thử Voges-Proskauer (VP) ở nhiệt độ phòng như sau: Chuyển 1 ml chủng cấy 48 h vào ống nghiệm và ủ phần còn lại của canh thang MR-VP thêm 48 h ở 35 °C. Thêm 0,6 ml naphthol (4.27) và lắc đều. Tiếp tục thêm 0,2 ml dung dịch kali hydroxit 40 % (4.29) và lắc đều. Để tăng nồng độ và tăng tốc độ phản ứng, thêm vài tinh thể creatin (4.28). Đọc kết quả sau 4 h; Nếu môi trường chuyển màu đỏ hồng ruby là phản ứng dương tính. Hầu hết chủng cấy *Salmonella* âm tính VP (môi trường không chuyển màu).
- 2) Thực hiện phép thử metyl đỏ như sau: cho 5 ml canh thang 96 h MR-VP, thêm 5 đến 6 giọt chất chỉ thị metyl đỏ (4.31). Đọc kết quả ngay. Hầu hết chủng cấy *Salmonella* cho kết quả dương tính, cho thấy bởi màu đỏ phai trong môi trường. Phản ứng âm tính có màu vàng đặc trưng. Loại bỏ các chủng cấy không phải *Salmonella* (có các phản ứng KCN và VP dương tính và phản ứng metyl đỏ âm tính).

Bảng 3 – Các tiêu chí để loại bỏ các chủng cấy không phải *Salmonella*

Phép thử hoặc cơ chất	Kết quả
1. Urease	dương tính (màu đỏ tía)
2. Phép thử indol và phép thử ngưng kết (H) đa giá hoặc phép thử ngưng kết Spicer-Edwards	dương tính (màu tím trên bề mặt) âm tính (không ngưng kết)
3. Canh thang lysin decarboxylase KCN	âm tính (màu vàng) dương tính (vi sinh vật phát triển)
4. Canh thang phenol đỏ lactose	dương tính (màu vàng và/hoặc sinh khí) ^{a,b}
5. Canh thang phenol đỏ sacarose	dương tính (màu vàng và/hoặc sinh khí) ^b
6. Canh thang KCN, phép thử Voges-Proskauer, phép thử metyl đỏ	dương tính (Vi sinh vật phát triển) dương tính (màu hồng đến đỏ) âm tính (màu vàng phai)

^a Thử tiếp các chủng cấy dương tính với canh thang malonat để xác định có phải là *Salmonella arizonae*.

^b Không bỏ các chủng cấy canh thang dương tính nếu các chủng cấy LIA tương ứng cho các phản ứng *Salmonella* điển hình; thử tiếp để xác định có phải là các loài *Salmonella*

TCVN 11039-5:2015

d) Thạch xitrat Simmons

Ria cấy trên mặt nghiêng và cấy đâm sâu vào thạch xitrat Simmons (4.13) vi khuẩn phát triển trên mặt nghiêng của thạch TSI chưa xác định. Ủ 96 h ± 2 h ở 35 °C trong tủ ẩm (5.10). Đọc kết quả như sau:

Dương tính: có vi sinh vật phát triển, thường kèm theo sự thay đổi từ màu xanh lá sang màu xanh lam. Hầu hết chủng cấy *Salmonella* dương tính xitrat.

Âm tính: không có vi sinh vật phát triển hoặc có rất ít vi sinh vật phát triển nhưng không đổi màu.

8.7 Phương pháp thay thế xác định *Salmonella*

Phương pháp thay thế cho cách thử các phản ứng sinh hóa thông thường, dùng một trong năm kit sinh hóa thương mại (API 20E, Enterotube II, *Enterobacteriaceae* II, MICRO-ID hoặc Vitek GNI) để nhận diện *Salmonella* giả định. Lựa chọn kit thương mại phù hợp với các tính chất sinh hóa trong phần nhận diện.

Các kit sinh hóa thương mại không được sử dụng để thay thế các phép thử huyết thanh.

Lắp ráp các bộ phận của thiết bị và chuẩn bị thuốc thử cần cho bộ kit. Cấy từng đơn vị theo AOAC 978.24 (API 20E, Enterotube II, *Enterobacteriaceae* II), AOAC 989.12 (MICRO-ID), AOAC 991.13 (Vitek GNI), ủ trong thời gian và nhiệt độ quy định. Bổ sung thuốc thử, quan sát và ghi kết quả. Đối với việc nhận diện vi sinh vật giả định, phân loại chủng cấy, thực hiện theo AOAC là *Salmonella* hoặc không phải *Salmonella*.

Đối với việc khẳng định các chủng cấy giả định được nhận diện là *Salmonella*, thực hiện phép thử ngưng kết kháng huyết thanh thân (O) *Salmonella* (8.5.6) và phép thử ngưng kết kháng huyết thanh lông (H) *Salmonella* (8.5.3) hoặc phép thử ngưng kết (H) Spicer-Edwards (8.5.4) để phân loại chủng cấy theo hướng dẫn sau:

- Báo cáo các chủng cấy là *Salmonella* được khẳng định từ *Salmonella* giả định bằng các kit sinh hóa thương mại nếu chủng cấy dương tính với phép thử ngưng kết kháng huyết thanh (O) *Salmonella* và phép thử (H) *Salmonella*.
- Loại bỏ các chủng cấy giả định không phải là *Salmonella* bằng các kit sinh hóa thương mại nếu chủng cấy phù hợp với các tiêu chí AOAC về chủng cấy không phải *Salmonella*.
- Đối với chủng cấy không phù hợp với a hoặc b, phân loại theo các phép thử bổ sung (8.6) hoặc gửi đến phòng thử nghiệm để xác định typ huyết thanh và nhận diện.

8.8 Xử lý các chủng cấy âm tính với phép thử ngưng kết kháng huyết thanh lông (H)

Nếu chủng cấy có các tính chất sinh hóa phù hợp với *Salmonella* nhưng cho kết quả ngưng kết với kháng huyết thanh (H) âm tính (xem 8.5.3) có thể là do các chủng này không di động hoặc các kháng

nguyên lông phát triển không trọn vẹn. Tiến hành kiểm tra như sau: Đổ môi trường thử tính di động (4.18) vào đĩa Petri (5.16). Dùng que cấy lấy một lượng nhỏ vi khuẩn phát triển trên mặt nghiêng thạch TSI cấy đâm sâu lên đĩa môi trường, cách cạnh đĩa khoảng 10 mm, sâu từ 2 mm đến 3 mm. Không cấy chạm đến đáy đĩa hoặc ở vị trí khác. Ủ 24 h ở 35 °C trong tủ ẩm (5.10).

Nếu thấy vi khuẩn di chuyển 40 mm hoặc lớn hơn thì thử nghiệm lại như sau: Chuyển một vòng cấy vi khuẩn đã di chuyển xa nhất vào canh thang trypticase đậu tương-tryptose (4.11). Lập lại phép thử ngưng kết (H) đa giá hoặc phép thử huyết thanh Spicer-Edwards. Nếu các chủng cấy không di động sau 24 h đầu thì ủ thêm 24 h ở 35 °C trong tủ ẩm (5.10); Nếu vẫn không di động thì ủ tiếp 5 ngày ở 25 °C. Kết luận chủng cấy không di động nếu các phép thử trên vẫn cho kết quả âm tính.

9 Biểu thị kết quả

Theo các kết quả diễn giải (xem 8.6, 8.7 hoặc 8.8), chỉ rõ sự có mặt hay không có mặt của *Salmonella* trong 25 g phần mẫu thử.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử nghiệm đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy chọn cũng như các sự cố bất kỳ có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị môi trường cấy và thuốc thử**A.1 Canh thang lactose****A.1.1 Thành phần**

Chất chiết thịt bò	3 g
Pepton	5 g
Lactose	5 g
Nước cất	1 lít

A.1.2 Chuẩn bị

Phân phối các phần 225 ml vào các bình nón 500 ml. Sau khi hấp áp lực ở 121 °C trong 15 min và ngay trước khi sử dụng, chỉnh vô trùng đến thể tích 225 ml. pH cuối cùng đạt $6,9 \pm 0,2$.

A.2 Canh thang selenit cystin**A.2.1 Môi trường 1****A.2.1.1 Thành phần**

Tryptone hoặc polypepton	5 g
Lactose	4 g
Natri hydro selenit (NaHSeO_3)	4 g
Natri hydro phosphat (Na_2HPO_4)	10 g
L-Cystin	0,01 g
Nước cất	1 lít

A.2.1.2 Chuẩn bị

Đun đến sôi để hòa tan. Phân phối các phần 10 ml vào các ống nghiệm 16 mm x 150 mm vô trùng. Đun 10 min trong hơi nước (flowing steam). Không hấp áp lực. pH cuối cùng đạt $7,0 \pm 0,2$. Không khử trùng môi trường này. Sử dụng trong ngày chuẩn bị.

A.2.2 Môi trường 2 (North-Bartram điều chỉnh)**A.2.2.1 Thành phần**

Polypepton	5 g
Lactose	4 g
Natri hydro selenit (NaHSeO_3)	4 g
Natri hydro phosphat (Na_2HPO_4)	5,5 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	4,5 g
L-Cystin	0,01 g
Nước cất	1 lít

A.2.2.2 Chuẩn bị

Gia nhiệt có khuấy để hòa tan. Phân phối các phần 10 ml vào các ống nghiệm 16 mm x 150 mm vô trùng. Gia nhiệt 10 min trong hơi nước. Không khử trùng môi trường này. Sử dụng trong ngày chuẩn bị.

A.3 Canh thang tetrathionat**A.3.1 Thành phần**

Polypepton	5 g
Các muối mật	1 g
Canxi cacbonat	10 g
Natri thiosulfat ngâm năm phân tử nước	30 g
Nước cất	1 lít

A.3.2 Chuẩn bị

Tạo huyền phù các thành phần trong 1 lít nước cất, trộn và đun sôi (phần kết tủa sẽ không tan hoàn toàn). Không hấp áp lực. Để nguội đến dưới 45 °C. Bảo quản ở nhiệt độ từ 5 °C đến 8 °C. pH cuối cùng đạt $8,4 \pm 0,2$.

A.4 Môi trường Rappaport-Vassiliadis**A.4.1 Thành phần****a) Canh thang cơ bản**

Tryptone	5 g
Natri clorua (NaCl)	8 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	1,6 g
Nước cất	1 lít

TCVN 11039-5:2015

b) Dung dịch magie clorua:

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

c) Dung dịch malachite green oxalat:

Malachite green oxalat	0,4 g
Nước cất	100 ml

A.4.2 Chuẩn bị

Để chuẩn bị môi trường hoàn chỉnh, gộp 1000 ml canh thang, 100 ml Dung dịch magie clorua và 10 ml Dung dịch malachite green oxalat (tổng thể tích môi trường hoàn chỉnh là 1110 ml). Canh thang cơ bản phải được chuẩn bị cùng ngày với các thành phần cấu tạo nên môi trường hoàn chỉnh. Dung dịch magie clorua có thể bảo quản trong tối ở nhiệt độ phòng được 1 năm. Để chuẩn bị dung dịch này, hòa tan hoàn toàn lượng $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ từ vật chứa mới mở nắp dựa theo công thức, bởi vì loại muối này rất hút ẩm. Dung dịch malachite green oxalat có thể bảo quản trong chai tối màu ở nhiệt độ phòng đến 6 tháng. Phân phối các thể tích 10 ml môi trường hoàn chỉnh vào các ống nghiệm 16 mm x 150 mm. Hấp áp lực 15 min ở 115 °C. pH cuối cùng đạt $5,5 \pm 0,2$. Bảo quản trong tủ lạnh và dùng trong 1 tháng.

Môi trường này phải chuẩn bị từ các thành phần riêng lẻ. Không nên sử dụng môi trường khô bán sẵn. Người sử dụng môi trường này cần nhận thức rõ công thức và nhiệt độ ủ môi trường này khác với hướng dẫn của tiêu chuẩn này.

A.5 Thạch xylose lysin desoxycholat (XLD)

A.5.1 Thành phần

Chất chiết nấm men	3 g
Sắt (III) amoni xitrat	0,8 g
L-lysin	5 g
Natri thiosulfat	6,8 g
Xylose	3,75 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Lactose	7,5 g
Thạch	15 g
Sacarose	7,5 g
Phenol đỏ	0,08 g
Natri desoxycholat	2,5 g
Nước cất	1 lít

A.5.2 Chuẩn bị

Gia nhiệt có khuấy ngay đến khi sôi ở mức độ trung bình. Không để quá nhiệt. Rót vào các đĩa khi môi trường nguội đến 50 °C. Để khô trong khoảng 2 h, mở hé nắp. Sau đó đậy nắp. pH cuối cùng $7,4 \pm 0,2$. Không bảo quản quá 1 ngày.

A.6 Thạch Hektoen Enteric (HE)**A.6.1 Thành phần**

Pepton	12 g
Natri thiosulfat	5 g
Chất chiết nấm men	3 g
Sắt (III) amoni xitrat	1,5 g
Muối mật	9 g
Bromthymol xanh	0,064 g
Lactose	12 g
Fuchsin axit	0,1 g
Sacarose	12 g
Thạch	13,5 g
Salicin	2 g
Nước cất	1 lít
Natri clorua (NaCl)	5 g

A.6.2 Chuẩn bị

Đun đến sôi, khuấy liên tục để hòa tan. Để sôi không quá 1 min. Không để quá nhiệt. Để nguội trong nồi cách thủy. Rót các phần 20 ml vào các đĩa Petri 15 mm x 100 mm vô trùng. Để khô trong khoảng 2 h, mở hé nắp. pH cuối cùng $7,6 \pm 0,2$. Không bảo quản quá 1 ngày.

A.7 Thạch bismuth sulfit (Wilson and Blair)**A.7.1 Thành phần**

Polypepton (hoặc pepton)	10 g
Chất chiết thịt bò	5 g
Dextrose	5 g
Natri hydro phosphat (Na_2HPO_4) (dạng khan)	4 g
FeSO_4 (dạng khan)	0,3 g
Bismuth sulfit (chất chỉ thị)	8 g
Brilliant green	0,025 g
Thạch	20 g
Nước cất	1 lít

A.7.2 Chuẩn bị

Trộn kỹ và đun có khuấy. Để sôi khoảng 1 min đến khi thu được huyền phù đồng nhất (nếu kết lắng sẽ không hòa tan). Để nguội đến nhiệt độ từ 45 °C đến 50 °C. Tạo huyền phù phần kết lắng bằng cách khuấy nhẹ và rót các phần 20 ml vào các đĩa Petri 15 mm x 100 mm vô trùng. Để các đĩa khô trong khoảng 2 min, có mở hé nắp, sau đó đậy các đĩa. pH cuối cùng đạt $7,7 \pm 0,2$. Không hấp áp lực. Chuẩn bị các đĩa một ngày trước khi cấy ria và bảo quản trong tối. Độ chọn lọc giảm trong 48 h. Bảo quản các đĩa nơi tối.

A.8 Thạch sắt ba đường (TSI)**A.8.1 Môi trường****Môi trường 1**

Polypepton	20 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Lactose	10 g
Sacarose	10 g
Glucose	1 g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0,2 g
Phenol đỏ	0,025 g
Thạch	13 g
Nước cất	1 lít

Môi trường 2

Chất chiết thịt bò	3 g
Chất chiết nấm men	3 g
Pepton	15 g
Proteose pepton	5 g
Glucose	1 g
Lactose	10 g
Sacarose	10 g
Sắt (II) sulfat (FeSO_4)	0,2 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0,3 g
Phenol đỏ	0,024 g
Thạch	12 g
Nước cất	1 lít

Hai môi trường này nói chung có thể thay thế nhau.

A.8.2 Chuẩn bị

Tạo huyền phù các thành phần của Môi trường 1 trong nước cất, trộn kỹ và gia nhiệt, thỉnh thoảng có khuấy. Để sôi khoảng 1 min cho hòa tan các thành phần. Cho vào 1/3 các ống 16 mm x 150 mm và đậy nắp hoặc nút lại để duy trì các điều kiện hiếu khí. Hấp áp lực Môi trường 1 trong 15 min ở 118 °C. Chuẩn bị Môi trường 2 như đối với Môi trường 1, nhưng không hấp áp lực 15 min ở 121 °C. Trước khi môi trường đông đặc, nghiêng các ống để có các bề mặt nghiêng từ 4 cm đến 5 cm và độ sâu từ 2 cm đến 3 cm. pH cuối cùng đạt $7,3 \pm 0,2$ đối với Môi trường 1 và $7,4 \pm 0,2$ đối với Môi trường 2.

A.9 Thạch sắt lysin (Edwards and Fife)**A.9.1 Thành phần**

Gelysate hoặc pepton	5 g
Chất chiết nấm men	3 g
Dextrose	1 g
L-Lysin hydroclorua	10 g
Sắt (III) amoni xitrat	0,5 g
Natri thiosulfat (dạng khan)	0,04 g
Bromcresol tía	0,02 g
Thạch	15 g
Nước cất	1 lít

A.9.2 Chuẩn bị

Gia nhiệt để hòa tan các thành phần. Phân phối các phần 4 ml vào các ống nắp xoáy 13 mm x 100 mm. Hấp áp lực 12 min ở 121 °C. Để cho đông đặc ở vị trí nghiêng để tạo thành các đậy 4 cm và bề mặt nghiêng 2,5 cm. pH cuối cùng đạt $6,7 \pm 0,2$.

A.10 Canh thang trypton (tryptophan), 1 %**A.10.1 Thành phần**

Tryptone hoặc trypticase	10 g
Nước cất	1 lít

A.10.2 Chuẩn bị

Phân phối các phần 5 ml vào các ống nghiệm 16 mm x 125 mm hoặc 16 mm x 150 mm. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. pH cuối cùng đạt $6,9 \pm 0,2$.

TCVN 11039-5:2015

A.11 Canh thang trypticase đậu tương-tryptose

A.11.1 Thành phần

Canh thang trypticase đậu tương (loại khô, bán sẵn)	15 g
Canh thang tryptose (loại khô, bán sẵn)	13,5 g
Chất chiết nấm men	3 g
Nước cất	1 lít

A.11.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong 1 lít nước. Đun nhẹ để hòa tan. Phân phối các phần 5 ml vào các ống nghiệm 16 mm x 150 mm. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. pH cuối cùng đạt $7,2 \pm 0,2$.

A.12 Canh thang MR-VP

A.12.1 Môi trường 1

A.12.1.1 Thành phần

Bột nước đệm pepton	7 g
Glucose	5 g
Kali hydro phosphat (K_2HPO_4)	5 g
Nước cất	1 lít

A.12.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong 800 ml nước có đun nhẹ. Lọc và để nguội đến 20 °C và pha loãng đến 1 lít. Hấp áp lực từ 12 min đến 15 min ở 121 °C. pH cuối cùng đạt $6,9 \pm 0,2$.

A.12.2 Môi trường 2

A.12.2.1 Thành phần

Pepton casein	3,5 g
Pepton thịt	3,5 g
Dextrose	5 g
Kali phosphat	5 g
Nước cất	1 lít

A.12.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước có đun nhẹ nếu cần. Phân phối 10 ml vào các ống nghiệm 16 mm x 150 mm và hấp áp lực 15 min ở nhiệt độ từ 118 °C đến 121 °C. pH cuối cùng đạt $6,9 \pm 0,2$.

A.12.3 Môi trường 3**A.12.3.1 Thành phần**

Pepton	5 g
Glucose	5 g
Đệm phosphat	5 g
Nước cất	1 lít

A.12.3.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước. Phân phối 10 ml vào các ống nghiệm 16 mm x 150 mm và hấp áp lực 12 min đến 15 min ở 121 °C. pH cuối cùng đạt $7,5 \pm 0,2$.

A.13 Thạch xitrat Simmons**A.13.1 Thành phần**

Natri xitrat ngậm hai phân tử nước	2 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Kali hydro phosphat (K_2HPO_4)	1 g
Amoni dihydro phosphat ($NH_4H_2PO_4$)	1 g
Magie sulfat ($MgSO_4$)	0,2 g
Bromthymol xanh	0,08 g
Thạch	15 g
Nước cất	1 lít

A.13.2 Chuẩn bị

Đun nhẹ, thỉnh thoảng khuấy. Để sôi từ 1 min đến 2 min đến khi thạch hoà tan. Cho vào các ống nắp xoay 13 mm x 100 mm hoặc 16 mm x 150 mm đến 1/3 ống. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. Trước khi môi trường đông đặc, nghiêng các ống để có các bề mặt nghiêng từ 4 cm đến 5 cm và độ sâu từ 2 cm đến 3 cm. pH cuối cùng đạt $6,8 \pm 0,2$.

A.14 Canh thang ure**A.14.1 Thành phần**

Ure	20 g
Chất chiết nấm men	0,1 g
Kali hydro phosphat (K_2HPO_4)	9,1 g
Natri hydro phosphat (Na_2HPO_4)	9,5 g
Phenol đỏ	0,01 g
Nước cất	1 lít

TCVN 11039-5:2015

A.14.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước cất. Không gia nhiệt. Khử trùng bằng cách lọc qua màng 0,45 μm . Phân phối vô trùng các phần từ 1,5 ml đến 3,0 ml vào các ống nghiệm 13 mm x 100 mm vô trùng. pH cuối cùng đạt $6,8 \pm 0,2$.

A.15 Canh thang ure (chuẩn bị nhanh)

A.15.1 Thành phần

Ure	20 g
Chất chiết nấm men	0,1 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	0,091 g
Natri hydro phosphat (Na_2HPO_4)	0,095 g
Phenol đỏ	0,01 g
Nước cất	1 lít

A.15.2 Chuẩn bị

Chuẩn bị như Canh thang ure (A.14).

A.16 Canh thang malonat

A.16.1 Thành phần

Chất chiết nấm men	1 g
Amoni sulfat [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]	2 g
Kali hydro phosphat (K_2HPO_4)	0,6 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	0,4 g
Natri clorua (NaCl)	2 g
Natri malonat	3 g
Dextrose	0,25 g
Bromthymol xanh	0,025 g
Nước cất	1 lít

A.16.2 Chuẩn bị

Đun để hòa tan, nếu cần. Phân phối các phần 3 ml vào các ống nghiệm 13 mm x 100 mm. Hấp áp lực 15 min ở 121 $^{\circ}\text{C}$. pH cuối cùng đạt $6,7 \pm 0,2$.

A.17 Canh thang lysin decarboxylase (Falkow)**A.17.1 Thành phần**

Gelysate hoặc pepton	5 g
Chất chiết nấm men	3 g
Glucose	1 g
L-Lysin	5 g
Bromcresol tia	0,02 g
Nước cất	1 lít

A.17.2 Chuẩn bị

Đun đến khi hòa tan. Phân phối các phần 5 ml và các ống nắp vặn 16 mm x 125 mm. Hấp áp lực các ống đã vặn lỏng nắp trong 15 min ở 121 °C. Vặn nắp kín khi bảo quản và sau mỗi lần cấy. pH cuối cùng đạt $6,8 \pm 0,2$.

A.18 Môi trường thử nghiệm tính di động (bán đặc)**A.18.1 Thành phần**

Chất chiết thịt bò	3 g
Pepton hoặc gelysate	10 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Thạch	4 g
Nước cất	1 lít

A.18.2 Chuẩn bị

Gia nhiệt đồng thời khuấy và đun sôi 1-2 min để hòa tan thạch. Phân phối các phần 20 ml vào các ống nắp xoáy 20 mm x 150 mm, thay bằng nắp lỏng. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. Để nguội đến 45 °C sau khi hấp áp lực. Vặn chặt nắp và bảo quản lạnh ở nhiệt độ từ 5 °C đến 8 °C. Để sử dụng, làm tan chảy trong nước sôi hoặc dòng hơi nước rồi để nguội đến 45 °C. Phân phối vô trùng các phần 20 ml vào các đĩa Petri 15 mm x 100 mm vô trùng. Đậy các đĩa và để cho đông đặc. Sử dụng trong ngày chuẩn bị. pH cuối cùng đạt $7,4 \pm 0,2$.

A.19 Canh thang kali xyanua (KCN)**A.19.1 Thành phần**

Kali xyanua	0,075 g
Proteose pepton No. 3 hoặc polypepton	3 g
Natri clorua (NaCl)	5g

TCVN 11039-5:2015

Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	0,225 g
Natri hydro phosphat (Na_2HPO_4)	5,64 g
Nước cất	1 lit

A.19.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trên, ngoại trừ kali xyanua và hấp áp lực 15 min ở 121 °C. Để nguội rồi làm lạnh đến nhiệt độ từ 5 °C đến 8 °C. pH cuối cùng đạt $7,6 \pm 0,2$. Chuẩn bị dung dịch gốc kali xyanua bằng cách hòa tan 0,5 g kali xyanua trong 100 ml nước cất vô trùng đã làm lạnh đến nhiệt độ từ 5 °C đến 8 °C. Dùng pipet bầu, thêm 15 ml dung dịch gốc kali xyanua vào 1 lit base lạnh vô trùng. Không hút pipet bằng miệng. Sử dụng găng tay.

Trộn và phân phối vô trùng các phần từ 1,0 ml đến 1,5 ml vào các ống 13 mm x 100 mm vô trùng. Dùng kỹ thuật vô trùng, nút các ống bằng nút bần No. 2 có tẩm parafin. Chuẩn bị nút bần bằng cách đun sôi trong parafin khoảng 5 min. Nút các ống bằng nút bần sao cho parafin không chảy vào canh thang mà tạo thành lớp xi giữa miệng ống và nút bần. Bảo quản ống ở nhiệt độ từ 5 °C đến 8 °C không quá 2 tuần trước khi sử dụng.

A.20 Canh thang cacbohydrat phenol đỏ

A.20.1 Thành phần

Trypticase hoặc proteose pepton No. 3	10 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Chất chiết thịt bò (tùy chọn)	1 g
Phenol đỏ (7,2 ml dung dịch phenol đỏ 0,25 %)	0,018 g
Nước cất	1 lit

Cacbohydrat, sử dụng một trong ba loại đường sau:

Dulcitol	5 g
Lactose	10 g
Sacarose	10 g

A.20.2 Chuẩn bị

Hòa tan cacbohydrat vào canh thang cơ bản này. Phân phối các phần 2,5 ml vào các ống nghiệm 13 mm x 100 mm chứa các ống Durham. Hấp áp lực 10 min ở 118 °C. pH cuối cùng đạt $7,4 \pm 0,2$. Cách khác, hòa tan các thành phần, ngoại trừ cacbohydrat, trong 800 ml nước cất có đun và thỉnh thoảng khuấy. Phân phối các phần 2,0 ml vào các ống nghiệm 13 mm x 100 mm chứa các ống lên men đã úp ngược. Hấp áp lực 15 min ở 118 °C và để nguội. Hòa tan cacbohydrat trong 200 ml nước cất và khử trùng bằng cách cho dung dịch qua bộ lọc vi khuẩn. Thêm vô trùng 0,5 ml dịch lọc vào mỗi ống canh thang đã khử trùng sau khi làm nguội đến 45 °C. Lắc nhẹ để trộn. pH cuối cùng đạt $7,4 \pm 0,2$.

A.21 Canh thang cacbohydrat đỏ tía**A.21.1 Thành phần**

Proteose pepton No. 3	10 g
Chất chiết thịt bò (tùy chọn)	1 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Bromcresol tía	0,02 g
Nước cất	1 lít

A.21.2 Chuẩn bị

Chuẩn bị như đối với canh thang phenol đỏ cacbohydrat (A.20). pH cuối cùng đạt $6,8 \pm 0,2$.

A.22 Thạch MacConkey**A.22.1 Thành phần**

Proteose pepton hoặc polypepton	3 g
Pepton hoặc gelysate	17 g
Lactose	10 g
Các muối mật No. 3 (hoặc hỗn hợp các muối mật):	1,5 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Đỏ trung tính	0,03 g
Tím tinh thể	0,001 g
Thạch	13,5 g
Nước cất	1 lít

A.22.2 Chuẩn bị

Tạo huyền phù các thành phần và đun có khuấy để hòa tan. Để sôi trong từ 1 min đến 2 min. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C, để nguội đến nhiệt độ từ 45 °C đến 50 °C, và rót các phần 20 ml vào các đĩa Petri 15 mm x 100 mm vô trùng. Để khô ở nhiệt độ phòng, có đậy nắp. Không dùng các đĩa ẩm. pH cuối cùng đạt $7,1 \pm 0,2$.

A.23 Canh thang và thạch dịch tim não (BHI)**A.23.1 Môi trường 1****A.23.1.1 Thành phần**

Dịch não bê	200 g
Dịch tim bò	250 g

TCVN 11039-5:2015

Proteose pepton hoặc gelysate	10 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	2,5 g
Dextrose	2 g
Nước cất	1 lít

A.23.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước cất, có đun nhẹ. Phân phối canh thang vào các chai hoặc các ống nghiệm để bảo. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. pH cuối cùng đạt $7,4 \pm 0,2$.

A.23.2 Môi trường 2

A.23.2.1 Thành phần

Bột tim não	6 g
Pepton thịt	6 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Dextrose	3 g
Pepton gelatin	14,5 g
Natri hydro phosphat (Na ₂ HPO ₄)	2,5 g
Nước cất	1 lít

A.23.2.2 Chuẩn bị

Tạo huyền phù các thành phần Môi trường 2 trong nước cất và đun trong 1 min để hòa tan hoàn toàn.

Đối với cả Môi trường 1 và Môi trường 2, phân phối canh thang vào cả chai và ống nghiệm để bảo quản. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. pH cuối cùng đạt $7,4 \pm 0,2$. Có thể dùng BHI có bán sẵn.

Để chuẩn bị thạch tim não, thêm 15 g thạch vào 1 lít canh thang BHI. Đun để hòa tan thạch trước khi phân phối vào các chai hoặc các bình nón. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C.

A.24 Thạch máu tryptose cơ bản

A.24.1 Thành phần

Tryptose	10 g
Chất chiết thịt bò	3 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Thạch	15 g
Nước cất	1 lít

A.24.2 Chuẩn bị

Tạo huyền phù các thành phần trong nước cất, trộn kỹ và gia nhiệt, thỉnh thoảng khuấy. Để sôi khoảng 1 min. Cho vào các ống 16 mm x 150 mm đến 1/3 ống và đậy nắp hoặc vặn nút để duy trì các điều kiện hiếu khí. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. Trước khi môi trường đông đặc, nghiêng các ống để có các bề mặt nghiêng từ 4 cm đến 5 cm và độ sâu từ 2 cm đến 3 cm.

A.25 Dung dịch papain, 5 % (khối lượng/thể tích)**A.25.1 Thành phần**

Papain	50 g
Nước cất	1 lít

A.25.2 Chuẩn bị

Thêm papain vào nước cất vô trùng và xoay bình để hòa tan hoàn toàn. Phân phối các phần 100 ml vào các chai.

A.26 Thuốc thử Kovacs**A.26.1 Thành phần**

p-Dimethylaminobenzaldehyde	5 g
2-Metylbutan-2-ol (amyl alcohol)	75 ml
Axit clohydric (HCl) đặc	25 ml

A.26.2 Chuẩn bị

Hòa tan p-dimethylaminobenzaldehyde trong amyl alcohol. Thêm từ từ axit clohydric (HCl) đặc. Bảo quản ở 4 °C. Để thử indol, thêm từ 0,2 ml đến 0,3 ml thuốc thử đã chuẩn bị vào 5 ml chủng cấy vi khuẩn trong canh thang trypton 24 h. Phản ứng dương tính indol nếu có màu đỏ sẫm trên lớp bề mặt.

A.27 Các thuốc thử Voges-Proskauer (VP)**A.27.1 Thành phần**

Dung dịch 1:

alpha-Naphthol	5 g
Etanol (tuyệt đối)	100 ml

Dung dịch 2:

Kali hydroxit	40 g
Nước cất đến	100 ml

TCVN 11039-5:2015

A.27.2 Chuẩn bị

Phép thử Voges-Proskauer (VP). Ở nhiệt độ phòng, chuyển 1 ml chủng cấy 48 h vào ống nghiệm và thêm 0,6 ml dung dịch 1 và 0,2 ml dung dịch 2. Lắc sau khi thêm mỗi dung dịch. Để tăng cường độ và tốc độ phản ứng, thêm vài tinh thể creatin vào hỗn hợp. Đọc kết quả 4 h sau khi thêm các thuốc thử. Phản ứng dương tính nếu xuất hiện màu hồng eosin.

A.28 Dung dịch kali hydroxit, 40 % (khối lượng/thể tích)

Kali hydroxit (KOH)	40 g
Nước cất vừa đủ	100 ml

A.29 Nước muối vô trùng, 0,85 %

A.29.1 Thành phần

Natri clorua (NaCl)	8,5 g
Nước cất	1 lít

A.29.2 Chuẩn bị

Hòa tan 8,5 g natri clorua trong nước. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. Để nguội đến nhiệt độ phòng.

A.30 Nước muối formalin

A.30.1 Thành phần

Dung dịch formaldehyde (từ 36 % đến 38 %)	6 ml
Natri clorua (NaCl)	8,5 g
Nước cất	1 lít

A.30.2 Chuẩn bị

Hòa tan 8,5 g natri clorua trong 1 lít nước cất. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. Để nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm 6 ml dung dịch formaldehyde. Không hấp áp lực sau khi thêm formaldehyde.

A.31 Chất chỉ thị metyl đỏ

A.31.1 Thành phần

Metyl đỏ	0,1 g
Etanol (95 %)	300 ml
Nước cất	500 ml

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] TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật.*
- [3] TCVN 8128-1:2009 (ISO/TS 11133-1:2009) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và sản xuất môi trường nuôi cấy – Phần 1: Hướng dẫn chung về đảm bảo chất lượng đối với việc chuẩn bị môi trường nuôi cấy trong phòng thử nghiệm.*
- [4] FDA, *Bacteriological Analytical Manual*, Chapter 5, *Salmonella*
-