

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9582:2013

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN
STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN**

Foodstuffs – Method for detection of Staphylococcal enterotoxin

HÀ NỘI – 2013

Lời nói đầu

TCVN 9582:2013 được xây dựng dựa theo AOAC 976.31 *Staphylococcal Enterotoxin in Foods-Microslide Gel Double Diffusion Test*;

TCVN 9582:2013 do Trung tâm Kiểm tra vệ sinh thú y Trung ương I – Cục Thú y biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm – Phương pháp phát hiện Staphylococcal enterotoxin

Foodstuffs – Method for detection of Staphylococcal enterotoxin

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện enterotoxin do *Staphylococcus aureus* sinh ra trong thực phẩm và dịch chiết thực phẩm cô đặc, bằng kỹ thuật khuếch tán trong thạch hai lớp trên lam kính.

Giới hạn phát hiện của phương pháp từ 0,1 µg/ml đến 0,01 µg/ml.

2 Tài liệu viện dẫn

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

TCVN 4830-1:2005 (ISO 6888-1:1999, Amd 1:2003), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Phương pháp định lượng staphylococci có phản ứng dương tính coagulase (Staphylococcus aureus và các loài khác) trên đĩa thạch. Phần 1: Kỹ thuật sử dụng môi trường thạch Baird-Parker.*

TCVN 4830-2:2005 (ISO 6888-2:1999, Amd 1:2003), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Phương pháp định lượng staphylococci có phản ứng dương tính coagulase (Staphylococcus aureus và các loài khác) trên đĩa thạch. Phần 2: Kỹ thuật sử dụng môi trường thạch fibrinogen huyết tương thỏ.*

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.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Enterotoxin (Enterotoxin)

Độc tố do vi sinh vật sản sinh ra gây ngộ độc thực phẩm và gây tác động ở ruột. Enterotoxin là ngoại độc tố bền nhiệt, không bị phá hủy ngay cả khi đun sôi 100 °C trong 30 min nên độc tố vẫn có khả năng gây ngộ độc khi vi khuẩn đã bị tiêu diệt trong quá trình chế biến.

3.2

Staphylococcal enterotoxin (Staphylococcal enterotoxin)

Độc tố gây bệnh đường ruột do vi khuẩn tụ cầu vàng (*Staphylococcus aureus*) sinh ra. Staphylococcal enterotoxin là loại độc tố gây ngộ độc thực phẩm phổ biến với các triệu chứng như buồn nôn, nôn mửa, tiêu chảy, đau quặn bụng xuất hiện trong vòng vài giờ sau khi ăn.

4 Nguyên tắc

Khi kháng nguyên tương ứng với từng typ enterotoxin trong huyết thanh khuếch tán qua thạch và kết hợp với kháng thể đặc hiệu của nó thì xuất hiện vạch kết tủa. Việc nhận dạng typ enterotoxin trong mẫu thử được khẳng định khi có sự hợp nhất giữa vạch kết tủa của mẫu thử với vạch kết tủa chuẩn (là kết quả của sự kết hợp giữa typ enterotoxin đã biết và kháng thể đặc hiệu của nó).

5 Môi trường và thuốc thử

5.1 Yêu cầu chung

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

5.2 Dung dịch thạch 0,2 %

Cho 2 gam thạch (loại dùng cho vi khuẩn) vào 1 lit nước sôi và đun sôi cho đến khi tan hoàn toàn. Rót từng lượng 20 ml đến 30 ml thạch hòa tan vào các bình dung tích 180 ml hoặc tương đương, bảo quản ở nhiệt độ phòng. Làm tan chảy lại khi cần dùng để phủ lam kính.

5.3 Thạch dịch chiết não tim (BHI) 0,7% thạch (khối lượng/thể tích)

Chỉnh canh thang BHI đến pH 5,3; Thêm thạch (loại dùng cho vi khuẩn) theo tỷ lệ 0,7 %, đun sôi nhẹ để hòa tan. Phân phối từng lượng 25 ml vào trong các ống nghiệm 25 mm x 200 mm, hấp tiệt trùng ở 121 °C trong 10 min. Ngay trước khi sử dụng, rót vô trùng môi trường đã hấp trong ống nghiệm vào các đĩa petri 15 mm x 100 mm.

5.4 Kháng huyết thanh enterotoxin

Pha loãng huyết thanh đông khô bằng nước muối sinh lý 0,9% theo chỉ dẫn của nhà cung cấp. Bảo quản các kháng huyết thanh dung dịch gốc (nồng độ đậm đặc) và dung dịch làm việc ở 4 °C; để bảo quản dài hạn, nên đông khô hoặc làm lạnh âm sâu.

5.5 Enterotoxin chuẩn

Hoàn nguyên enterotoxin đông khô (như 5.4), theo chỉ dẫn của nhà cung cấp.

5.6 Thạch khuếch tán

Cho 1,2 % thạch tinh khiết (loại dùng cho vi khuẩn) vào dung dịch cơ bản (bao gồm các chất được hòa tan trong nước cất theo tỷ lệ: NaCl 0,85 %; natri barbital 0,8 %; merthiolate 1:10.000 ở nồng độ cuối cùng), đun sôi để hòa tan. Sau đó, chỉnh pH đến 7,4 và lọc nóng qua hai lớp giấy lọc chất lượng phân tích (6.14). Bảo quản các lượng 15 ml đến 25 ml trong các ống nghiệm có nắp vặn (6.12).

5.7 Dung dịch nhuộm màu

Thuốc nhuộm R đỏ Thiazine 0,1 % trong dung dịch axit axetic (CH_3COOH) 1 %.

5.8 Nước cất vô trùng

Phân phối từng lượng 5 ml nước cất vào các ống nghiệm và hấp tiệt trùng ở 121 °C trong 15 min. Có thể thay nước cất bằng nước muối sinh lý 0,9 %.

5.9 Chuẩn đo độ đục

Chuẩn bị dung dịch chuẩn McFarland số 1 bằng cách pha 1 phần dung dịch bari clorua BaCl_2 1 % (khối lượng/thể tích) với 99 phần dung dịch axit sulfuric H_2SO_4 1 % (khối lượng/thể tích) vào trong ống nghiệm (6.12).

6 Thiết bị và dụng cụ

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

6.1 Que loại bọt khí (Debubblers), que thủy tinh được kéo rất mảnh, tương tự như làm pipet mao quản, sau đó cắt từng đoạn dài khoảng 6 cm và hàn kín phần đuôi trên ngọn lửa.

6.2 Bảng dính cách điện, kích thước 0,25 mm x 19,1 mm.

6.3 Lam kính, bằng thủy tinh trơn, phẳng, đã được làm sạch. Kích thước: 7,62 cm x 2,54 cm; dày 0,96 mm đến 1,06 mm.

6.4 Pipet Pasteur, kéo dài từ đầu ống thủy tinh một đoạn khoảng 7 mm hoặc sử dụng loại pipet dùng 1 lần, dung tích 30 μl hoặc 40 μl .

6.5 Đĩa Petri, kích thước 20 mm x 150 mm và 15 mm x 100 mm.

6.6 Bản nhựa (Xem Hình 1).

TCVN 9582:2013

6.7 Chất bôi trơn Silicon, loại mỡ có độ chân không cao.

6.8 Bình nhuộm màu¹⁾, bằng thủy tinh, có nắp đậy.

6.9 Que dàn mẫu vô trùng, bằng thủy tinh, uốn cong que thủy tinh như gậy đánh khúc côn cầu và hơ lửa để làm nhẵn.

6.10 Miếng cao su xốp nhân tạo (bọt biển) bão hòa nước, kích thước khoảng 1,5 cm x 1,5 cm x 6,5 cm. Có thể thay bằng miếng bông được làm bão hòa nước.

6.11 Ống ly tâm, dung tích 50 ml.

6.12 Ống nghiệm, kích thước 25 mm x 200 mm.

6.13 Que gỗ vô trùng.

6.14 Giấy lọc, loại dùng cho phân tích.

7 Lấy mẫu

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

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

8 Chuẩn bị mẫu thử

8.1 Nuôi cấy và phân lập *Staphylococcus aureus*

Nuôi cấy, phân lập và đếm số lượng *Staphylococcus aureus* trong mẫu thực phẩm theo TCVN 4830-1:2005 (ISO 6888-1:1999, Amd 1:2003) hoặc TCVN 4830-2:2005 (ISO 6888-2:1999, Amd 1:2003).

8.2 Chuẩn bị dịch cấy xác định enterotoxin từ các khuẩn lạc *Staphylococcus aureus* phân lập

8.2.1 Chuẩn bị dịch huyền phù vi khuẩn

Chọn ít nhất 4 khuẩn lạc *Staphylococcus aureus* đã phân lập trên môi trường đếm và phục hồi để cấy vào các ống thạch dinh dưỡng nghiêng hoặc môi trường tương tự. Ủ các ống thạch dinh dưỡng ở 35 °C đến 37 °C từ 18 h đến 24 h.

Lấy một khayên đầy sinh khối vi khuẩn từ bề mặt mỗi ống thạch dinh dưỡng nghiêng, nghiền đều vào một ống 5,0 ml nước cất hoặc nước muối sinh lý vô trùng (5.8). Độ đục của các ống dịch huyền phù vi khuẩn này được so sánh và điều chỉnh sao cho tương đương với độ đục của ống McFarland số 1

¹⁾ Bình của hãng Coplin hoặc Wheaton, thông tin này đưa ra nhằm tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm này.

chuẩn (khoảng 3×10^8 vi khuẩn/ml) (5.9).

8.2.2 Chuẩn bị dịch cấy xác định enterotoxin

Dùng pipet 1 ml vô trùng cấy 4 giọt huyền phù vi khuẩn lên bề mặt của thạch mềm BHI (5.3). Dàn đều các giọt dịch cấy lên khắp bề mặt thạch mềm bằng que dàn mẫu thủy tinh vô trùng (6.9). Lật ngược các đĩa thạch và ủ ở 35°C đến 37°C trong 48 h.

Dùng que gỗ vô trùng (6.13) chuyển toàn bộ lượng thạch đã cấy trong đĩa petri vào ống ly tâm (6.12) và ly tâm với lực gia tốc hướng tâm $32.800 \times g$ trong 10 min cho tới khi tách riêng thạch và vi khuẩn. Phần dịch cấy tách riêng được đem kiểm tra để nhận biết typ huyết thanh enterotoxin.

9 Cách tiến hành

9.1 Chuẩn bị lam kính

9.1.1 Quán băng dính

Quán 2 lần băng dính cách điện (6.2) xung quanh lam kính (6.3) đã được làm sạch, để lại một khoảng bằng 2,0 cm ở trung tâm, theo cách sau: Trước hết, đặt miếng băng dính dài khoảng 9,5 cm đến 10 cm ở mặt dưới của lam kính, cách mép ngoài cạnh ngắn 0,5 cm, sau đó quán chặt xung quanh hai vòng. Làm tương tự với cạnh ngắn còn lại của lam kính. Dùng gạc tẩm cồn lau sạch khoảng giữa hai miếng băng dính và lau lại bằng gạc khô.

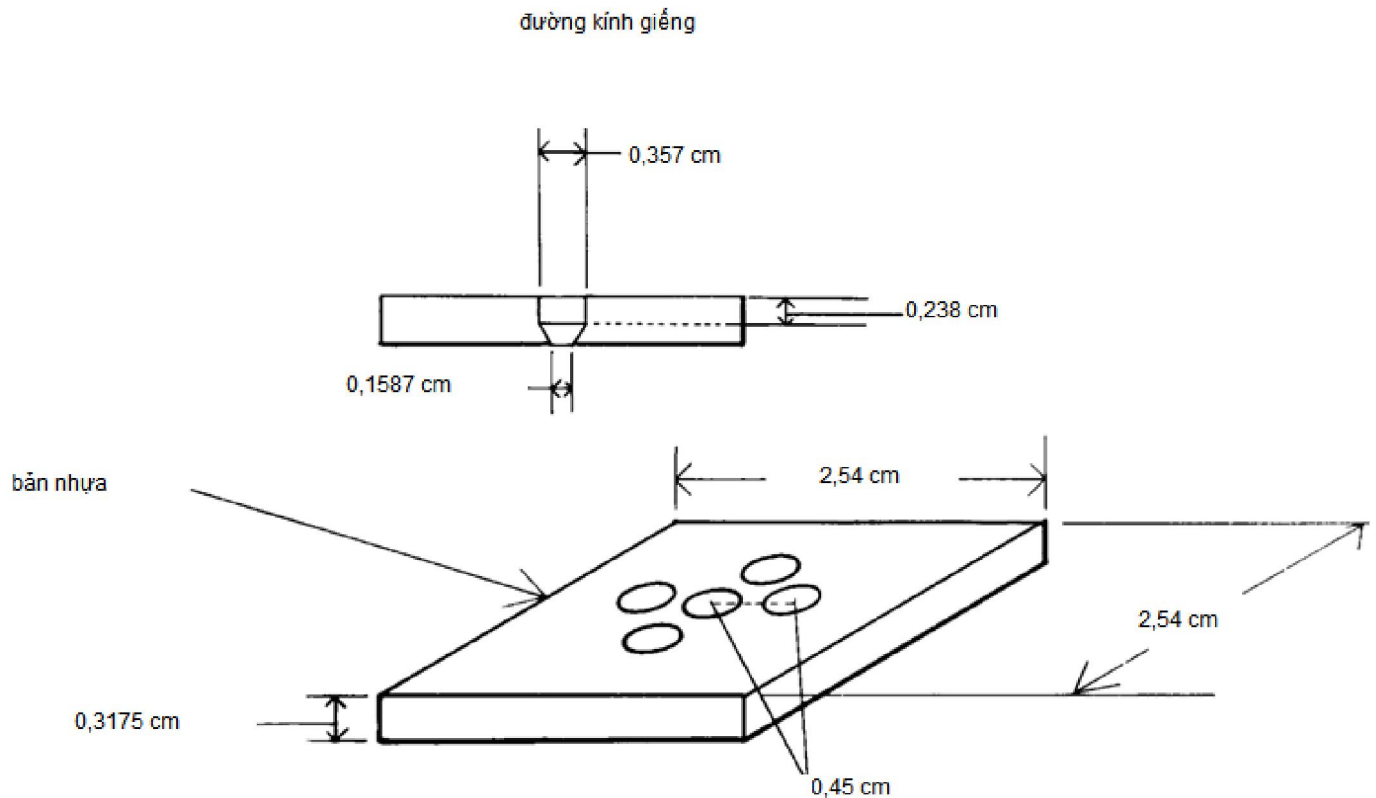
9.1.2 Phủ thạch

Đun chảy dung dịch thạch 0,2 % (5.2) trong ống nghiệm có nắp vặn và giữ ở 55°C hoặc cao hơn. Giữ lam kính trên cốc thủy tinh được làm nóng tới khoảng 65°C đến 85°C và rót hoặc dàn đều dung dịch thạch 0,2 % (5.2) đã chuẩn bị ở trên vào phần lam kính giữa hai miếng băng dính. Gạt phần thạch thừa xuống cốc để sử dụng lại và lau sạch mặt dưới của lam kính. Đặt lam kính vào khay và để khô ở chỗ không khí không có bụi (ví dụ trong tủ ẩm). Nếu lam kính không sạch, thạch sẽ không phủ đều trên lam kính.

9.1.3 Lắp ráp lam kính

Chuẩn bị những bản nhựa (6.6) theo chỉ dẫn ở Hình 1. Bôi một lớp màng mỏng chất bôi trơn silicon (6.7) trên mặt của bản nhựa sẽ được đặt sát mặt thạch (ví dụ mặt có lỗ nhỏ hơn). Đổ khoảng 0,4 ml thạch khuyếch tán 1,2 % (5.6) đã được đun chảy và để nguội tới khoảng 55°C đến 60°C vào giữa 2 miếng băng dính của lam kính đã chuẩn bị (9.1.1). Sau đó lập tức đặt bản nhựa (6.6) đã phủ silicon lên phía trên lớp thạch bằng cách đặt một cạnh lên gờ của băng dính thứ nhất và nhẹ nhàng đặt góc bên kia lên gờ của băng dính thứ hai. Đặt 2 miếng bọt biển hoặc bông thấm nước (khoảng 1,5 cm x 1,5 cm x 6,5 cm) (6.10) đã bão hòa nước cất ở rìa ngoài của mỗi đĩa petri 20 mm x 150 mm (6.5). Ngay sau

khi thạch vừa đông, đặt lam kính đã lắp ráp vào trong đĩa petri vừa chuẩn bị, mỗi đĩa từ 2 đến 4 lam kính. Dán nhãn lên lam kính và ghi các thông tin cần thiết.



Hình 1 – Sơ đồ bản nhựa để lắp ráp tiêu bản

9.2 Thử nghiệm khuếch tán trong thạch trên lam kính

CHÚ THÍCH: Vẽ mô phỏng bản nhựa trên phiếu kết quả các chất cho vào mỗi giếng, số ký hiệu của lam kính để chuẩn bị cho báo cáo kết quả.

9.2.1 Tiến hành thử nghiệm

CHÚ THÍCH: Mỗi thử nghiệm cần dùng 2 lam kính (9.1.3), một lam kính để tiến hành phản ứng và một lam kính để đối chứng.

9.2.1.1 Lam kính phản ứng

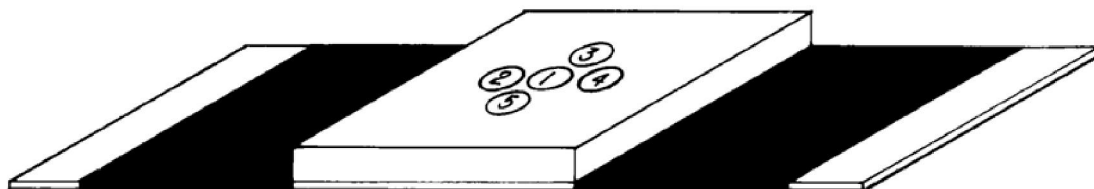
Nhỏ kháng huyết thanh có độ pha loãng thích hợp vào giếng ở giữa, nhỏ các enterotoxin chuẩn tương ứng vào các giếng xung quanh và nhỏ dịch cấy (8.2.2) để xác định enterotoxin vào giếng bên cạnh enterotoxin chuẩn. Xem Hình 2 (1) về thứ tự sắp xếp chất phản ứng cho việc phát hiện đồng thời 2 typ enterotoxin (hệ phát hiện nhị giá). Sử dụng pipet Pasteur hoặc pipet dùng một lần, dung tích 30 µl hoặc 40 µl (6.4) làm đầy các giếng bằng chất thử đến khi bề mặt dung dịch vòng lên. Để cho dung dịch chất thử vào đầy một phần pipet mao quản và chạm nhẹ vào thành ống đựng dịch mẫu thử để loại bỏ chất thử thừa. Từ từ hạ thấp pipet vào trong giếng cho tới khi chạm mặt thạch và làm đầy đến khi bề mặt dung dịch vòng lên. Nhìn tương phản trên nền đen, dùng que loại bọt khí (6.1) chọc bỏ bọt khí trong tất cả các giếng. Để các lam kính trong các đĩa petri đầy nắp đã có chứa miếng bọt biển hoặc

bông ướt (6.10) và ủ ở nhiệt độ phòng từ 48 h đến 72 h (thông thường, việc để các lam kính ủ ở 35 °C trong 24 h thích hợp cho dịch nuôi cấy). Cần thận di chuyển bản nhựa bằng cách trượt sang một bên. Nếu cần, làm sạch bằng cách nhúng lam kính vào nước và lau mặt dưới lam kính. Ngâm lam kính trong dung dịch nhuộm màu (5.7) từ 5 min đến 10 min để làm nổi các vạch kết tủa.

Để bảo quản lam kính cho lưu giữ lâu dài, nhúng lam kính vào nước để rửa sạch mọi dung dịch chất phản ứng, sau đó liên tục ngâm lam kính vào dãy các bể, mỗi bể 10 min theo thứ tự: dung dịch nhuộm màu, CH₃COOH 1 %, CH₃COOH 1 % (giống như bể trước) và CH₃COOH 1 % có 1 % glycerol. Thấm hết chất lỏng thừa trên lam và để khô trong tủ ẩm 35 °C. Sau một thời gian bảo quản dài, có thể không nhìn rõ vạch kết tủa nên cần phải ngâm lam kính vào nước.

9.2.1.2 Lam kính đối chứng

Chỉ nhỏ enterotoxin chuẩn và kháng huyết thanh enterotoxin để xác định khả năng phản ứng đúng của các chất thử. Thực hiện tương tự 9.2.1.1



(1) Nhị giá

1. Kháng huyết thanh tổ hợp (ví dụ kháng A và B)
2. Mẫu kiểm tra
3. Enterotoxin chuẩn (ví dụ typ A)
4. Mẫu kiểm tra
5. Enterotoxin chuẩn (ví dụ typ B)

(2) Đơn giá

1. Kháng huyết thanh (ví dụ kháng A)
2. Mẫu kiểm tra pha loãng
3. Enterotoxin chuẩn (ví dụ typ A)
4. Mẫu kiểm tra pha loãng
5. Mẫu kiểm tra pha loãng

Hình 2 - Sắp xếp các kháng huyết thanh và enterotoxin chuẩn tương ứng

- (1) Cho thử nghiệm phát hiện sự có mặt của cả hai enterotoxin (hệ phát hiện nhị giá)
- (2) Cho thử nghiệm pha loãng mẫu khi nồng độ enterotoxin trong mẫu quá cao (hệ phát hiện đơn giá)

9.2.2 Thu hồi lam kính và bản nhựa

Để thu hồi các lam kính cho sử dụng lại, rửa sạch mà không cần loại bỏ bằng dính cách điện (6.2).

Rửa các lam kính bằng nước máy để loại bỏ thạch, đun sôi từ 3 min đến 5 min trong nước máy có chất tẩy nhẹ, rửa bằng nước máy và sau đó là bằng nước cất, nhúng qua cồn, và dùng gạc lau khô.

Rửa các bản nhựa (6.6) bằng nước nóng (chưa sôi) có một lượng vừa phải chất tẩy mạnh, dùng gạc để lau sạch lớp màng silicon. Sau đó lần lượt rửa bằng nước máy, nước cất, và cồn; dùng gạc lau khô và vỗ cho hết cồn trong các giếng. Không để bản nhựa đã làm sạch tiếp xúc với nhiệt độ cao hoặc các dung môi hoà tan chất dẻo. Các bản nhựa và đặc biệt là các giếng phải khô ráo trước khi sử dụng lại.

10 Diễn giải kết quả

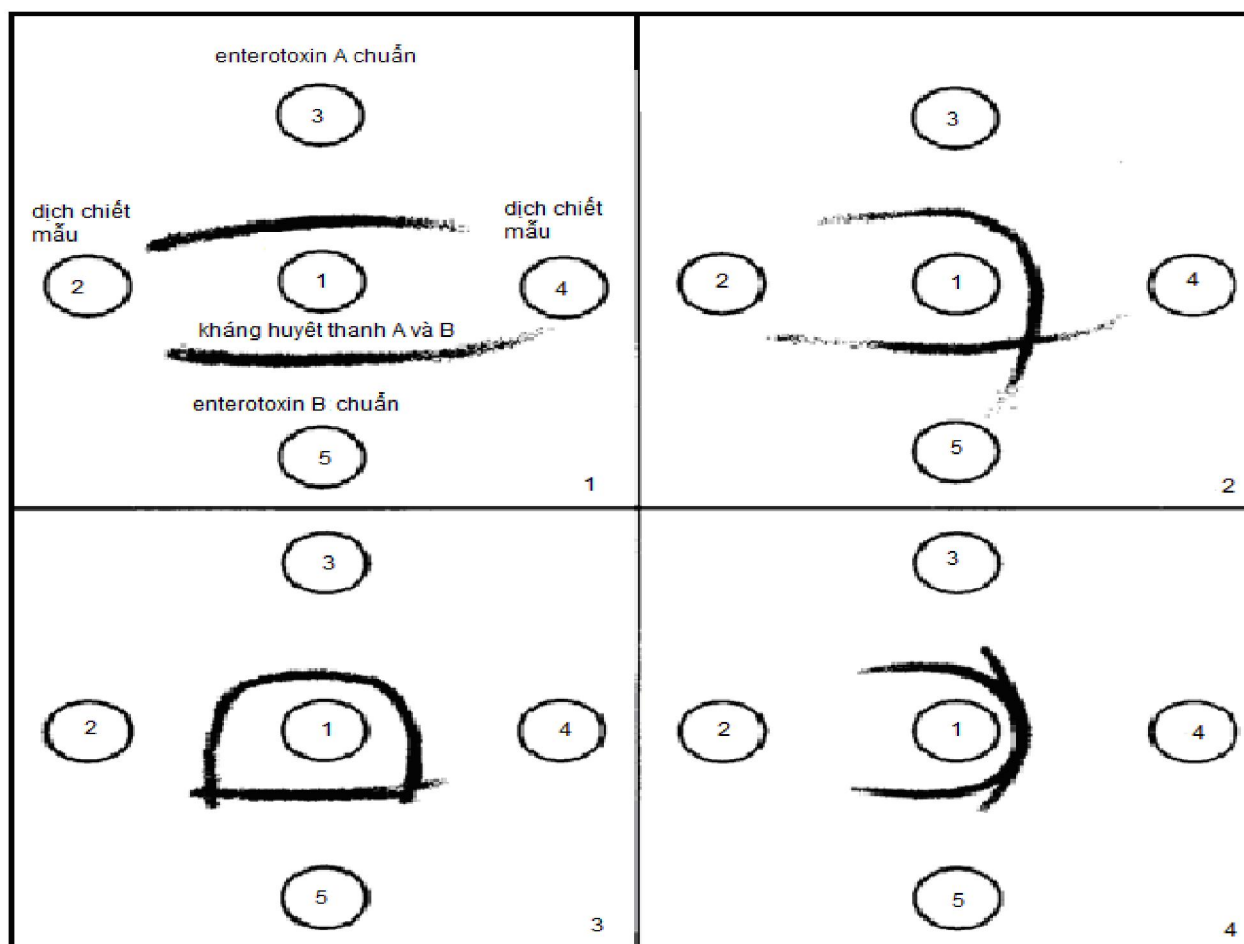
CHÚ THÍCH: Đọc các vạch kết tủa trên lam kính bằng cách giữ hơi chếch với nguồn sáng, tương phản trên nền đen. Phản ứng dương tính khi vạch kết tủa của mẫu thử hợp nhất với vạch kết tủa chuẩn.

10.1 Trường hợp phát hiện nhị giá

Hình 3 cho thấy thử nghiệm khuếch tán trong thạch trên lam kính thuộc hệ phát hiện nhị giá. Trong giếng 1 có kháng huyết thanh enterotoxin A và B; enterotoxin chuẩn typ A và B đã biết trong giếng 3 và 5, tương ứng tạo thành các vạch kết tủa chuẩn A và B; Mẫu thử trong giếng 2 và 4. Bốn phản ứng được diễn giải như sau:

- Không có vạch kết tủa xuất hiện giữa các mẫu thử: Không có enterotoxin A và B.
- Hợp nhất giữa vạch kết tủa của mẫu thử trong giếng 4 với vạch kết tủa của enterotoxin A chuẩn (có sự giao nhau giữa vạch kết tủa của mẫu thử với vạch kết tủa của enterotoxin B chuẩn): Không có enterotoxin A và B trong giếng 2; có enterotoxin A và không có enterotoxin B trong giếng 4.
- Có enterotoxin A và không có enterotoxin B trong cả hai giếng mẫu thử.
- Không có enterotoxin A và B trong mẫu thử ở giếng 2; có enterotoxin A và B trong mẫu ở giếng 4.

Người thao tác có thể đơn giản hóa thử nghiệm bằng cách chỉ chuẩn bị một mẫu để phát hiện hai loại enterotoxin khác nhau trên cùng một bộ lam kính.



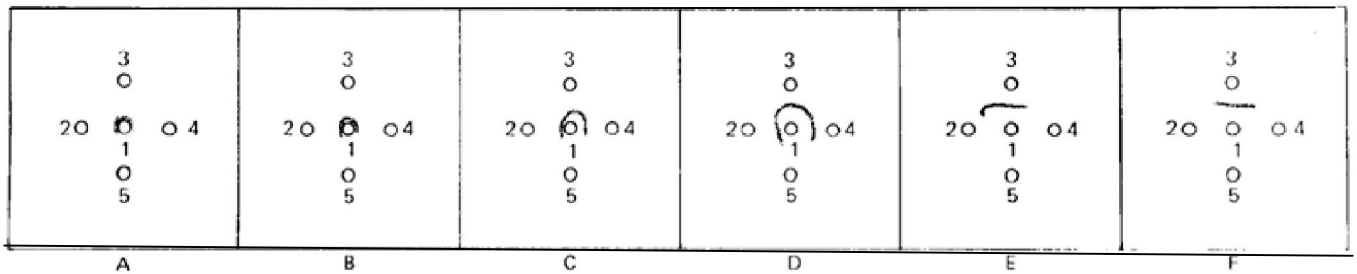
Hình 3 – Ví dụ về 4 phản ứng có thể xảy ra trong hệ phát hiện nhị giá

Xem 10.1 về việc giải thích các phản ứng.

10.2 Ảnh hưởng của nồng độ enterotoxin đến việc hình thành đường kết tủa tham chiếu

Nếu nồng độ enterotoxin trong mẫu thử quá cao, việc tạo thành đường kết tủa tham chiếu sẽ bị ức chế do độc tố khuếch tán nhanh qua thạch, do vậy, kháng thể chỉ khu trú bên trong giếng.

Hình 4 (A) cho thấy việc tạo thành vạch kết tủa chuẩn bị ức chế khi sử dụng nồng độ enterotoxin tương ứng với 10 µg/ml và 5 µg/ml. Hình 4 (B)-(F) cho thấy các dạng kết tủa khi lần lượt sử dụng enterotoxin với nồng độ thấp.



(1) Kháng huyết thanh	(1) Kháng huyết thanh	(1) Kháng huyết thanh	(1) Kháng huyết thanh	(1) Kháng huyết thanh	(1) Kháng huyết thanh
(2) 10 µg/ml enterotoxin	(2) 4 µg/ml enterotoxin	(2) 2 µg/ml enterotoxin	(2) 0,5 µg/ml enterotoxin	(2) 0,125 µg/ml enterotoxin	
(3) Enterotoxin chuẩn	(3) Enterotoxin chuẩn	(3) Enterotoxin chuẩn	(3) Enterotoxin chuẩn	(3) Enterotoxin chuẩn	(3) Enterotoxin chuẩn
(4) 5 µg/ml enterotoxin	(4) 3 µg/ml enterotoxin	(4) 1 µg/ml enterotoxin	(4) 0,25 µg/ml enterotoxin	(4) 0,0625 µg/ml enterotoxin	

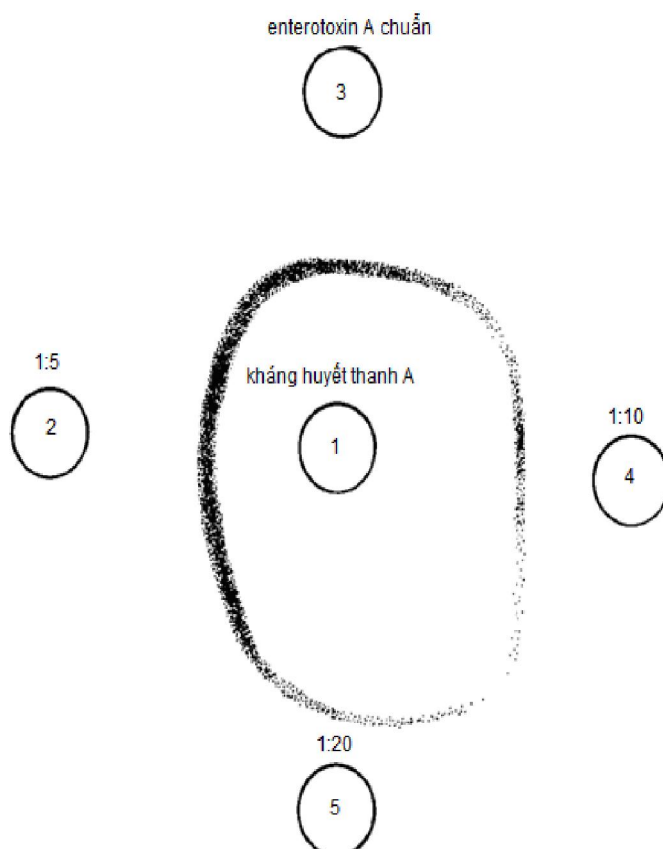
Hình 4 – Ảnh hưởng của nồng độ enterotoxin trong mẫu thử đến việc hình thành các đường kết tủa tham chiếu

Xem 10.2 cho việc giải thích các phản ứng.

10.3 Trường hợp phát hiện đơn giá

Nếu mẫu thử ức chế sự hình thành vạch kết tủa chuẩn như ở hình 4 (A), đem pha loãng dịch cấy mẫu thử (8.2.2), áp dụng hệ phát hiện đơn giá như ở hình 5. Việc sắp xếp chất phản ứng cho thử nghiệm pha loãng dịch cấy mẫu thử (8.2.2) được chỉ rõ ở hình 2 (2).

Hình 5 cho thấy thử nghiệm khuếch tán trong thạch trên lam kính thuộc hệ phát hiện đơn giá, trong đó kháng huyết thanh được cho vào giếng 1; enterotoxin chuẩn cho vào giếng 3; và các dịch cấy mẫu thử pha loãng (8.2.2) trong các giếng 2, 4, và 5. Không bắt đầu pha loãng dịch cấy mẫu thử (8.2.2) ở đậm độ cao tới mức vượt quá nồng độ phản ứng của enterotoxin.



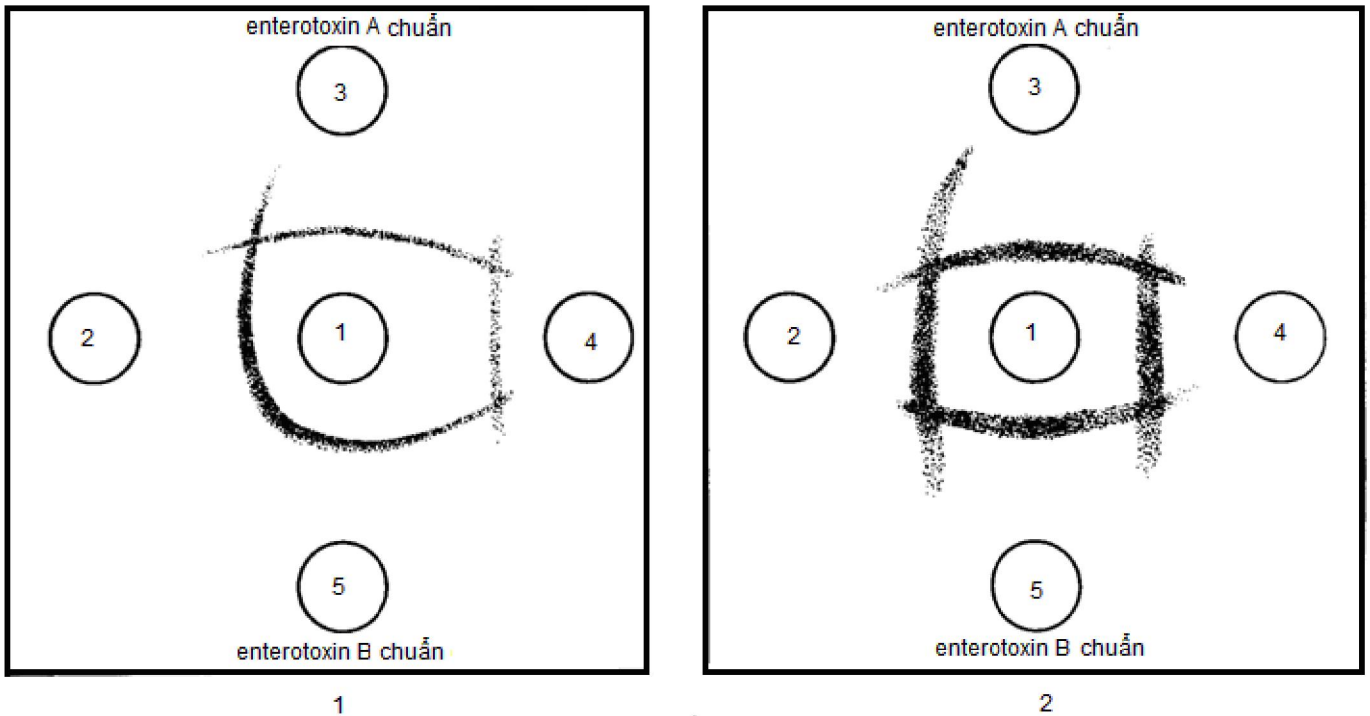
Hình 5 – Biểu hiện phép thử khuếch tán trong thạch trên lam kính trong hệ phát hiện đơn giá

10.4 Trường hợp không điển hình

Đôi khi, việc xuất hiện dạng vạch kết tủa không điển hình có thể gây khó khăn trong diễn giải kết quả cho những người phân tích thiếu kinh nghiệm. Một trong những phản ứng không điển hình phổ biến nhất là việc hình thành các vạch không liên quan đến độc tố mà do các kháng nguyên khác trong mẫu thử gây ra. Các ví dụ kiểu này được chỉ rõ trong hình 6 cho hệ phát hiện nhị giá. [Xem sự sắp xếp chất phản ứng trong hình 2 (1)].

Ở dạng vạch kết tủa trong hình 6 (1), mẫu thử trong giếng 4 có phản ứng không điển hình biểu thị qua vạch kết tủa không đặc hiệu (các vạch không nhận dạng được với enterotoxin chuẩn typ A và B). Các vạch này cắt ngang vạch kết tủa của enterotoxin chuẩn.

Ở dạng vạch kết tủa trong hình 6 (2), cả hai mẫu thử (giếng 2 và 4) đều âm tính với enterotoxin A và B nhưng hình thành vạch kết tủa không đặc hiệu cắt ngang vạch kết tủa enterotoxin chuẩn typ A và B.



Hình 6 – Các kiểu vạch kết tủa không đặc hiệu trong phép thử khuếch tán trong thạch trên lam kính

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- mọi sai lệch trong môi trường phân lập hoặc các điều kiện ủ đã sử dụng;
- mọi chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy lựa chọn, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- các kết quả thử nghiệm thu được.