

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 6402:2007**

**ISO 6785:2001**

Xuất bản lần 2

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA –  
PHÁT HIỆN *SALMONELLA***

*Milk and milk products - Detection of Salmonella*

HÀ NỘI - 2007

## **Lời nói đầu**

TCVN 6402:2007 thay thế TCVN 6402:1998;

TCVN 6402:2007 hoàn toàn tương đương với ISO 6785 : 2001/IDF 93:2001;

TCVN 6402:2007 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu*, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## **Sữa và sản phẩm sữa – Phát hiện *Salmonella***

*Milk and milk products – Detection of Salmonella spp*

### **1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện *Salmonella* trong sữa và sản phẩm sữa.

### **2 Tài liệu viện dẫn**

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

TCVN 6263:2007 (ISO 8261:2001), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật.

### **3 Thuật ngữ và định nghĩa**

Trong tiêu chuẩn này áp dụng các định nghĩa sau đây:

#### **3.1**

##### ***Salmonella* (*Salmonella*)**

các vi sinh vật hình thành các khuẩn lạc điển hình trên môi trường đặc chọn lọc và có các đặc tính sinh hóa và huyết thanh phù hợp với mô tả trong tiêu chuẩn này.

#### **3.2**

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

việc phát hiện sự có mặt hay không của loại vi sinh vật này trong một khối lượng hay một thể tích cụ thể, khi tiến hành thử theo tiêu chuẩn này.

## 4 Nguyên tắc

### 4.1 Khái quát

Việc phát hiện *Salmonella* cần thực hiện bốn giai đoạn liên tục (xem Phụ lục A).

### 4.2 Tiến tăng sinh trong môi trường lỏng không chọn lọc

Cấy phần mẫu thử vào môi trường tiến tăng sinh thích hợp và ủ ấm ở 37 °C từ 16 h đến 20 h.

### 4.3 Tăng sinh trong môi trường lỏng chọn lọc

Cấy dịch cấy thu được trong 4.2 vào môi trường Rappaport-Vasiliadis đã cải tiến magiê clorua/xanh malachit và môi trường selenit/xystin.

Ủ môi trường Rappaport-Vasiliadis đã cải tiến magiê clorua/xanh malachit trong nổi cách thủy hoặc trong tủ ấm (6.4) đặt 41,5 °C trong 24 h và tiếp theo 24 h nữa.

Ủ môi trường selenit/xystin trong tủ ấm (6.3) đặt ở 37 °C trong 24 h và tiếp theo 24 h nữa.

### 4.4 Cấy ria lên đĩa và nhận dạng

Cấy dịch cấy thu được (4.3) vào hai môi trường đặc chọn lọc (thạch lục sáng/đỏ phenol và bất kỳ môi trường đặc chọn lọc nào thích hợp).

**CHÚ THÍCH** Môi trường thích hợp cho phép nhận ra các chủng *Salmonella* lên men lactoza.

Ủ môi trường thạch lục sáng/đỏ phenol trong tủ ấm (6.3) đặt ở 37 °C và kiểm tra sau 20 h đến 24 h, nếu cần, sau 40 h đến 48 h kiểm tra lại sự có mặt của các khuẩn lạc mà từ các đặc tính của chúng được coi là *Salmonella* giả định.

Ủ môi trường đặc chọn lọc thứ hai ở nhiệt độ thích hợp và kiểm tra sau một khoảng thời gian thích hợp về sự có mặt của các khuẩn lạc mà từ các đặc tính của chúng được coi là *Salmonella* giả định.

### 4.5 Khẳng định

Cấy truyền các khuẩn lạc được coi là *Salmonella* (4.4) và khẳng định qua các thử nghiệm sinh hoá và huyết thanh học.

## 5 Môi trường nuôi cấy, thuốc thử và huyết thanh

Để tăng độ tái lập của kết quả, nên sử dụng các thành phần cơ bản khô, hoặc các môi trường hoàn chỉnh khô để chuẩn bị các môi trường nuôi cấy. Tuân thủ nghiêm ngặt các hướng dẫn của nhà sản xuất.

Chỉ sử dụng các loại thuốc thử được công nhận là loại tinh khiết phân tích, trừ khi có qui định khác.

Các giá trị pH được để cập đều qui về nhiệt độ ở 25 °C. Nếu cần, điều chỉnh bằng cách thêm axit clohydric [ $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$ ] hoặc dung dịch natri hydroxit [ $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$ ].

Nếu môi trường nuôi cấy và thuốc thử chưa sử dụng ngay thì phải bảo quản ở chỗ tối và ở nhiệt độ từ 0 °C đến + 5 °C nhưng không quá 1 tháng và trong các điều kiện không làm biến đổi thành phần của chúng, trừ khi có qui định khác.

## 5.1 Nước

Sử dụng nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương. Nước không được chứa các chất có thể ức chế sự phát triển các vi sinh vật ở các điều kiện thử nghiệm qui định trong tiêu chuẩn này.

## 5.2 Môi trường nuôi cấy

### 5.2.1 Môi trường tiến tăng sinh: nước đậm pepton

#### 5.2.1.1 Thành phần

Pepton	10,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Dinatri hydrooctophosphat ngậm 12 phân tử nước ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	9,0 g
Kali dihydrooctophosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,5 g
Nước	1 000 ml

#### 5.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng. Chính pH sao cho sau khi khử trùng là  $7,0 \pm 0,1$ .

Chuyển 225 ml môi trường vào các bình tam giác 500 ml (6.8) (hoặc theo bội số của 225 ml vào các bình có dung tích thích hợp). Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) đặt ở 121 °C. Làm nguội đến nhiệt độ phòng.

### 5.2.2 Môi trường tăng sinh chọn lọc thứ nhất: môi trường Rappaport-Vasiliadis đã cải tiến magiê clorua/xanh malachit (cạnh thang RVS)

#### 5.2.2.1 Dung dịch A

5.2.2.1.1 Thành phần

Dịch thuỷ phân đậu tương bằng enzym	5,0 g
Natri clorua (NaCl)	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

5.2.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng đến khoảng 70 °C. Chuẩn bị dung dịch A trong cùng ngày chuẩn bị môi trường RVS hoàn chỉnh.

5.2.2.2 Dung dịch B

5.2.2.2.1 Thành phần

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

5.2.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan magiê clorua trong nước. Vì magiê clorua là một loại muối rất hút ẩm, nên tốt nhất là hoà tan toàn bộ lượng  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  từ hộp đựng vừa mới mở nắp. Ví dụ, cho 250 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  vào 625 ml nước, để có được dung dịch 795 ml với nồng độ  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  khoảng 0,3 g/ml.

Dung dịch B có thể bảo quản trong chai thuỷ tinh màu nâu, kín khí, ở nhiệt độ phòng ít nhất 2 năm.

5.2.2.3 Dung dịch C

5.2.2.3.1 Thành phần

Malachit xanh oxalat	0,4 g
Nước	100 ml

5.2.2.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan malachit xanh oxalat trong nước.

Dung dịch C có thể bảo quản trong chai thuỷ tinh màu nâu ít nhất 8 tháng.

### 5.2.2.4 Môi trường hoàn chỉnh

#### 5.2.2.4.1 Thành phần

Dung dịch A (5.2.2.1)	1 000 ml
Dung dịch B (5.2.2.2)	100 ml
Dung dịch C (5.2.2.3)	10 ml

#### 5.2.2.4.2 Chuẩn bị

Cho 100 ml dung dịch B và 10 ml dung dịch C vào 1 000 ml dung dịch A. Chính pH sao cho sau khi khử trùng là  $5,2 \pm 0,1$ , nếu cần. Phân phối 10 ml dung dịch thu được vào các ống nghiệm (6.9) hoặc các bình vô trùng (6.8) có dung tích thích hợp, để thu được các phần cần thiết cho phép thử. Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) đặt ở  $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

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

### 5.2.3 Môi trường tăng sinh chọn lọc thứ hai: môi trường selenit/xystin

**CẢNH BÁO** Phải đặc biệt thận trọng khi sử dụng dung dịch selenit do độc tính tiềm ẩn của chúng. Trong mọi tình huống không được hút bằng miệng.

#### 5.2.3.1 Môi trường cơ bản

##### 5.2.3.1.1 Thành phần

Trypton	5,0 g
Lactoza	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

##### 5.2.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan ba thành phần cơ bản đầu tiên trong nước bằng cách đun sôi trong 5 phút. Sau khi để nguội cho thêm natri hydro selenit. Chính pH để sau khi khử trùng pH là  $7,0 \pm 0,1$ , nếu cần. Không khử trùng.

#### 5.2.3.2 Dung dịch L-Xystin

##### 5.2.3.2.1 Thành phần

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

##### 5.2.3.2.2 Chuẩn bị

## TCVN 6402:2007

Cho các thành phần trên vào bình cầu vô trùng định mức một vạch 100 ml. Pha loãng bằng nước vô trùng đến vạch mức. Không khử trùng.

### 5.2.3.3 Môi trường hoàn chỉnh

#### 5.2.3.3.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.2.3.1)	1 000 ml
Dung dịch L-Xystin (5.2.3.2)	10 ml

#### 5.2.3.3.2 Chuẩn bị

Cho dung dịch L-Xystin một cách vô trùng vào môi trường cơ bản. Chỉnh pH đến  $7,0 \pm 0,1$ , nếu cần. Phân phối môi trường này một cách vô trùng vào các bình vô trùng có dung tích thích hợp để có được các phần cần thiết cho thử nghiệm.

Môi trường này có thể được sử dụng cho đến khi xuất hiện kết tủa đỏ.

### 5.2.4 Môi trường đặc chọn lọc thứ nhất: Thạch lục sáng/đỏ phenol (Edel và Kampelmacher)

#### 5.2.4.1 Môi trường cơ bản

##### 5.2.4.1.1 Thành phần

Cao thịt bò	5,0 g
Pepton	10,0 g
Cao men	3,0 g
Dinatri hydrophosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1,0 g
Natri dihydrophosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	0,6 g
Thạch	từ 12 g đến 18 g <sup>a)</sup>
Nước	900 ml

a) Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

#### 5.2.4.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường cơ bản hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chỉnh pH, nếu cần, sao cho sau khi khử trùng là  $7,0 \pm 0,1$ . Chuyển môi trường cơ bản vào các ống nghiệm (6.9) hoặc bình tam giác (6.8) có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) đặt ở  $121^\circ\text{C}$ .



### 5.2.4.2 Dung dịch đường/đỏ phenol

#### 5.2.4.2.1 Thành phần

Lactoza	10,0 g
Sucroza	10,0 g
Đỏ phenol	0,09 g
Nước	≈ 80 ml

#### 5.2.4.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong khoảng 50 ml nước đựng trong bình cầu định mức một vạch 100 ml. Pha loãng bằng nước đến vạch. Làm nóng dung dịch 20 phút trên nồi cách thuỷ (6.5) để ở 70 °C. Làm nguội trên nồi cách thuỷ (6.5) khác để ở 55 °C. Sử dụng dung dịch này ngay sau khi làm nguội.

### 5.2.4.3 Dung dịch lục sáng

#### 5.2.4.3.1 Thành phần

Lục sáng (xem yêu cầu trong phụ lục B)	Khoảng 0,5 g
Nước	100 ml

#### 5.2.4.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan lục sáng trong nước. Bảo quản dung dịch này ít nhất 1 ngày ở nơi tối để tự khử trùng.

### 5.2.4.4 Môi trường hoàn chỉnh

#### 5.2.4.4.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.2.4.1)	900 ml
Dung dịch đường/đỏ phenol (5.2.4.2)	100 ml
Dung dịch lục sáng (5.2.4.3)	1 ml

#### 5.2.4.4.2 Chuẩn bị

Cho dung dịch lục sáng (5.2.4.3) một cách vô trùng vào dung dịch đường/đỏ phenol (5.2.4.2) đã được làm nguội trên nồi cách thuỷ (6.5) đến 55 °C. Cho dung dịch này vào môi trường cơ bản, đã được làm nóng trước trên nồi cách thuỷ đến 55 °C và trộn đều. Trong quá trình trộn, nhiệt độ của nồi cách thuỷ cần được giữ ở 50 °C đến 55 °C.

## TCVN 6402:2007

### 5.2.4.4.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Với một lượng thích hợp đĩa Petri lớn (6.12), cho vào mỗi đĩa khoảng 40 ml môi trường hoàn chỉnh vừa mới chuẩn bị (5.2.4.4). Nếu không có sẵn các đĩa lớn thì cho vào các đĩa nhỏ (6.12) mỗi đĩa khoảng 15 ml môi trường. Để cho đông đặc.

Nếu các đĩa thạch đã chuẩn bị trước thì chỉ được bảo quản không quá 4 h ở nhiệt độ phòng hoặc không quá 1 tuần ở nhiệt độ từ 0 °C đến + 5 °C.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô đĩa thạch cẩn thận (tốt nhất là mở nắp đĩa và lật úp mặt thạch xuống dưới) trong tủ sấy (6.2) đặt ở 50 °C hoặc đặt trong tủ thông khí tốt (6.2) cho đến khi bề mặt thạch khô.

### 5.2.5 Môi trường đặc chọn lọc thứ hai

Việc chọn môi trường thứ hai để cho phòng thử nghiệm chọn.

### 5.2.6 Thạch dinh dưỡng

#### 5.2.6.1 Thành phần

Cao thịt	3,0 g
Pepton	5,0 g
Thạch	Từ 12 g đến 18 g <sup>b)</sup>
Nước	1 000 ml
b) Tùy thuộc vào sức đông của thạch	

#### 5.2.6.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần môi trường khô hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước, bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là  $7,0 \pm 0,1$ , nếu cần. Chuyển môi trường này vào các ống nghiệm (6.9) hoặc các chai (6.8) có dung tích thích hợp. Khử trùng môi trường 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) đặt ở nhiệt độ 121 °C.

#### 5.2.6.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Chuyển khoảng 15 ml môi trường đã tan chảy vào các đĩa Petri (6.12) vô trùng và tiến hành theo 5.2.4.4.3.

### 5.2.7 Thạch đường/sắt III (thạch TSI)

## 5.2.7.1 Thành phần

Cao thịt	3,0 g
Cao men	3,0 g
Pepton	20,0 g
Natri clorua	5,0 g
Lactoza	10,0 g
Sucroza	10,0 g
Glucoza	1,0 g
Sắt (II) xitrat	0,3 g
Natri thiosunfat	0,3 g
Đỏ phenol	0,024 g
Thạch	Từ 12 g đến 18 g <sup>c)</sup>
Nước	1 000 ml
c) Tùy thuộc vào sức đông của thạch	

## 5.2.7.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là  $7,4 \pm 0,1$ , nếu cần. Phân phối môi trường này theo từng lượng 10 ml vào các ống nghiệm (6.9) có đường kính từ 17 mm đến 18 mm. Khử trùng môi trường 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121 °C. Để các ống nghiệm ở tư thế nghiêng để có được chiều sâu cột thạch là 2,5 cm và một mặt nghiêng dài 4 cm đến 5 cm.

## 5.2.8 Thạch urê (Christensen)

## 5.2.8.1 Môi trường cơ bản

## 5.2.8.1.1 Thành phần

Pepton	1,0 g
Glucoza	1,0 g
Natri clorua	5,0 g
Kali dihydrooctophosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2,0 g
Đỏ phenol	0,012 g
Thạch	Từ 12 g đến 18 g <sup>d)</sup>
Nước	1 000 ml
d) Tùy thuộc vào sức đông của thạch	

## TCVN 6402:2007

### 5.2.8.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần cơ bản khô hoặc cơ bản hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là  $6,8 \pm 0,1$ , nếu cần. Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ .

### 5.2.8.2 Dung dịch urê

#### 5.2.8.2.1 Thành phần

Urê	400 g
Nước vừa đủ	1 000 ml

#### 5.2.8.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan urê trong nước. Khử trùng qua lọc và kiểm tra lại độ vô trùng. (Đối với các chi tiết về kỹ thuật khử trùng qua lọc, tham khảo thêm các sách kỹ thuật về vi sinh vật).

### 5.2.8.3 Môi trường hoàn chỉnh

#### 5.2.8.3.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.2.8.1)	950 ml
Dung dịch urê (5.2.8.2)	50 ml

#### 5.2.8.3.2 Chuẩn bị

Trong điều kiện vô trùng, cho dung dịch urê vào môi trường cơ bản trước đó đã được làm tan chảy và làm nguội trên nồi cách thuỷ (6.5) đến  $45^{\circ}\text{C}$ . Phân phối môi trường hoàn chỉnh theo từng lượng 10 ml vào các ống nghiệm vô trùng (6.9). Đặt các ống nghiệm ở tư thế nghiêng.

### 5.2.9 Môi trường L-Lystin decacboxyl

#### 5.2.9.1 Thành phần

L-Lystin monohydroclorua	5,0 g
Cao men	3,0 g
Glucosa	1,0 g
Bromocresol tía	0,015 g
Nước	1 000 ml

### 5.2.9.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là  $6,8 \pm 0,1$ . Phân phối môi trường này theo từng lượng 5 ml sang các ống nuôi cấy (6.9). Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121 °C.

## 5.3 Thuốc thử

### 5.3.1 Dung dịch muối

#### 5.3.1.1 Thành phần

Natri clorua	8,5 g
Nước	1 000 ml

#### 5.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan natri clorua trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là  $7,0 \pm 0,1$ . Phân phối các lượng dung dịch sang các ống nghiệm (6.9) hoặc các bình tam giác (6.8) sao cho chúng chứa khoảng từ 90 ml đến 100 ml sau khi khử trùng. Khử trùng môi trường này 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121 °C.

### 5.3.2 Thuốc thử để phát hiện $\beta$ -galactosidaza

#### 5.3.2.1 Toluene

#### 5.3.2.2 Dung dịch đệm

##### 5.3.2.2.1 Thành phần

Natri dihydro phosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	6,9 g
Dung dịch natri hydroxit 10 mol/l	$\approx 3 \text{ ml}^{\text{e)}$
Nước	$\approx 50 \text{ ml}$
e) Tùy thuộc vào thể tích cần thiết để điều chỉnh pH.	

##### 5.3.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan natri dihydro phosphat trong khoảng 45 ml nước đựng trong bình định mức một vạch 50 ml. Chính pH đến  $7,0 \pm 0,1$  bằng dung dịch natri hydroxit. Pha loãng bằng nước đến vạch.

#### 5.3.2.3 Dung dịch ONPG

**5.3.2.3.1 Thành phần**

o-Nitrophenyl $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG)	0,08 mg
Nước	15 ml

**5.3.2.3.2 Chuẩn bị**

Hoà tan ONPG trong nước đã được ủ trước đến 50 °C. Làm nguội dung dịch đến nhiệt độ phòng.

**5.3.2.4 Thuốc thử hoàn chỉnh****5.3.2.4.1 Thành phần**

Dung dịch đệm (5.3.2.2)	5 ml
Dung dịch ONPG (5.3.2.3)	15 ml

**5.3.2.4.2 Chuẩn bị**

Cho dung dịch đệm vào dung dịch ONPG.

**5.3.3 Thuốc thử phản ứng Voges - Proskeuer (VP)****5.3.3.1 Môi trường VP****5.3.3.1.1 Thành phần**

Pepton	7,0 g
Glucoza	5,0 g
Dikali hydro phosphat ( $K_2HPO_4$ )	5,0 g
Nước	1 000 ml

**5.3.3.1.2 Chuẩn bị**

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là  $6,9 \pm 0,1$ , nếu cần. Chuyển các lượng 3 ml môi trường VP thu được sang các ống nghiệm (6.9). Khử trùng môi trường này 20 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121 °C.

**5.3.3.2 Dung dịch creatin (N-amlidinosarcosin)****5.3.3.2.1 Thành phần**

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

**5.3.3.2.2 Chuẩn bị**

Hoà tan creatin ngậm 1 phân tử nước vào trong nước.

**5.3.3.3 Dung dịch 1-naphtol trong etanol****5.3.3.3.1 Thành phần**

1-naphtol	6 g
Etanol, 96% (theo thể tích)	100 ml

**5.3.3.3.2 Chuẩn bị**

Hoà tan 1-naphtol trong etanol.

**5.3.3.4 Dung dịch kali hydroxit****5.3.3.4.1 Thành phần**

Kali hydroxit	40 g
Nước	100 ml

**5.3.3.4.2 Chuẩn bị**

Hoà tan kali hydroxit trong nước.

**5.3.4 Thuốc thử phản ứng Indol****5.3.4.1 Môi trường trypton/tryptophan****5.3.4.1.1 Thành phần**

Tripton	10 g
Natri clorua	5 g
DL-tryptophan	1 g
Nước	1 000 ml

**5.3.4.1.2 Chuẩn bị**

Hoà tan các thành phần trong nước sôi ở 100 °C trên nồi cách thuỷ (6.5). Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là  $7,5 \pm 0,1$ . Phân phối các lượng 5 ml môi trường thu được sang các ống nghiệm (6.9). Khử trùng môi trường này 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121 °C.

**5.3.4.2 Thuốc thử Kovacs****5.3.4.2.1 Thành phần**

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

**5.3.4.2.2 Chuẩn bị**

Trộn đều các thành phần trên.

**5.3.5 Thạch dinh dưỡng thể nửa đặc****5.3.5.1 Thành phần**

Cao thịt	3,0 g
Pepton	5,0 g
Thạch	Từ 4 g đến 9 g <sup>f)</sup>
Nước	1 000 ml
f) Tùy thuộc vào sức đông của thạch.	

**5.3.5.2 Chuẩn bị**

Hoà tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là  $7,0 \pm 0,1$ , nếu cần. Chuyển môi trường thu được sang các bình tam giác (6.8) có dung tích thích hợp. Khử trùng môi trường này 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121 °C.

**5.3.5.3 Chuẩn bị các đĩa thạch**

Cho môi trường mới chuẩn bị này theo từng lượng 15 ml vào các đĩa Petri vô trùng nhỏ (6.12). Không sấy khô các đĩa thạch này.

**5.4 Huyết thanh**

Một vài dạng huyết thanh ngưng kết có chứa kháng thể đối với một hoặc một số kháng nguyên O có bán sẵn trên thị trường, nghĩa là kháng huyết thanh có chứa một hoặc nhiều nhóm "O" (được coi là kháng huyết thanh O đơn giá hoặc đa giá), huyết thanh kháng Vi và kháng huyết thanh có chứa các kháng thể đối với một hoặc một vài nhân tố H (gọi là kháng huyết thanh H đơn giá hoặc đa giá).

Cần thử trước n. 5i lần để đảm bảo kháng huyết thanh đem sử dụng đủ điều kiện phát hiện mọi dạng huyết thanh *Salmonella*. Để hỗ trợ cho việc này, dùng kháng huyết thanh của một hãng cung cấp đã được công nhận (thí dụ một cơ quan Nhà nước thích hợp).



## 6 Thiết bị, dụng cụ

Có thể dùng dụng cụ sử dụng một lần thay thế cho các dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần nếu có các qui định phù hợp.

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thí nghiệm vi sinh thông thường và cụ thể là:

- 6.1 Thiết bị khử trùng ướt (nồi hấp áp lực), có thể duy trì được nhiệt độ ở  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  và  $115\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 6.2 Tủ sấy, có khả năng hoạt động ở  $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , được thông gió đối lưu, hoặc tủ thông gió laminar
- 6.3 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ ở  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 6.4 Nồi cách thủy hoặc tủ ấm, có khả năng hoạt động ở  $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 6.5 Các nồi cách thủy, có khả năng duy trì ở  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  và ở nhiệt độ sôi.
- 6.6 Que cấy vòng, bằng platin/iridi hoặc niken/crom, đường kính khoảng 3 mm.
- 6.7 pH mét, có thể đo chính xác đến  $\pm 0,1$  đơn vị pH ở nhiệt độ  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 6.8 Chai hoặc bình cấy, làm bằng kim loại không độc hoặc chất dẻo có nắp vặn.
- 6.9 Ống nghiệm đựng dịch cấy, đường kính 8 mm và dài 160 mm, hoặc các kích cỡ thích hợp khác.
- 6.10 Ống đong.
- 6.11 Pipet chia độ hoặc pipet tự động, có dung tích danh định là 10 ml và 1 ml, có vạch chia tương ứng 0,5 ml và 0,1 ml.
- 6.12 Đĩa Petri, cỡ nhỏ (đường kính từ 90 mm đến 100 mm) và/hoặc cỡ lớn (đường kính 140 mm).

## 7 Lấy mẫu

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

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong quá trình bảo quản và vận chuyển.

## 8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6263:2007 (ISO 8261:2001).

## 9 Cách tiến hành

### 9.1 Yêu cầu về an toàn

Xem điều 12.

### 9.2 Phân mẫu thử và tiến tăng sinh

#### 9.2.1 Khái quát

Để chuẩn bị dung dịch ban đầu, cho 25 g mẫu thử (điều 8) vào 225 ml môi trường tiến tăng sinh (5.2.1), đó là tỷ lệ của mẫu thử với môi trường tiến tăng sinh được quy định trong phương pháp này. Nếu phần mẫu thử khác với 25 g, thì sử dụng một lượng môi trường tiến tăng sinh cần thiết để tạo ra độ pha loãng 1/10 (khối lượng/thể tích).

#### 9.2.2 Sữa nguyên liệu, sữa đã xử lý nhiệt và các sản phẩm sữa dạng lỏng

Dùng pipet lấy 25 ml mẫu thử (điều 8) cho vào bình tam giác (6.8) chứa 225 ml môi trường tiến tăng sinh (5.2.1) và lắc đều.

#### 9.2.3 Sản phẩm sữa khô

Chuẩn bị một bình có nắp đậy (6.8) chứa 225 ml môi trường tiến tăng sinh (5.2.1).

Cân 25 g mẫu thử (điều 8) một cách vô trùng và đổ lên bề mặt chất lỏng đựng trong bình. Đậy nắp bình, không lắc. Để yên ở nhiệt độ phòng trong 60 phút  $\pm$  10 phút trước khi đem nuôi ấm. Không cần chỉnh pH. Nếu sau 1 giờ ủ ấm mà sữa bột vẫn chưa tan, thì dùng tay để lắc bình để trộn lượng chứa trong bình hoặc khuấy bằng dao trộn vô trùng.

#### 9.2.4 Lactoza

Cân 25 g mẫu thử (điều 8) một cách vô trùng cho vào 1 bình có nắp đậy chứa 225 ml môi trường tiến tăng sinh (5.2.1) và lắc cho đến tan.

#### 9.2.5 Casein, caseinat và phomat

Cân 25 g mẫu thử (điều 8) một cách vô trùng cho vào cốc đựng vô trùng của máy trộn tốc độ cao hoặc loại nhu động. Thêm 225 ml môi trường tiến tăng sinh (5.2.1) ở nhiệt độ 45 °C. Trộn cho đến khi mẫu thử phân tán đều (từ 1 phút đến 3 phút). Giữ nhiệt độ không được quá 45 °C.

#### 9.2.6 Bơ

Lắc mẫu thử (điều 8) đã được làm tan chảy. Dùng pipet để chuyển 25 ml phần mẫu thử đã được ủ trước đến khoảng 45 °C, cho vào bình tam giác (6.8) chứa 225 ml môi trường tiến tăng sinh (5.2.1) và lắc đều.

### 9.2.7 Sản phẩm sữa đông lạnh (kể cả kem thực phẩm)

Dùng pipet để chuyển 25 ml mẫu thử (điều 8) đã được làm tan chảy và ủ trước đến khoảng 37 °C, cho vào bình (6.8) chứa 225 ml môi trường tiến tăng sinh (5.2.1) và lắc đều.

### 9.2.8 Sữa lên men, sữa chua, bánh kem và món tránh miệng

Cân 25 g mẫu thử (điều 8) một cách vô trùng cho vào bình có nắp đậy (6.8) chứa các viên bi thủy tinh và 225 ml môi trường tiến tăng sinh (5.2.1) và lắc cho tan.

Để đơn giản việc kiểm tra, khi mẫu kiểm tra gồm nhiều phần mẫu thử 25 g được lấy ra từ lô hàng sữa hoặc sản phẩm sữa qui định cần kiểm tra, và khi chứng minh được việc tạo thành mẫu chung (gộp chung các phần mẫu thử) không làm ảnh hưởng đến kết quả của sữa hoặc sản phẩm sữa thì có thể gộp lại các phần mẫu thử. Ví dụ, nếu kiểm tra 10 mẫu thử, mỗi mẫu 25 g thì kết hợp 10 mẫu với nhau để tạo thành mẫu thử chung là 250 g và đem hoà tan hoặc khuếch tán trong 2,25 lít môi trường tiến tăng sinh.

Hoặc cách khác, các phần 0,1 ml môi trường tiến tăng sinh (môi trường RV) và 10 ml môi trường tiến tăng sinh (selenit/xystin) từ 10 phần riêng rẽ có thể kết hợp lại đem tăng sinh tương ứng trong 0,1 lít và 1 lít môi trường chọn lọc.

Kiểm tra pH của huyền phù và chỉnh đến  $6,8 \pm 0,1$  nếu cần, trừ khi có qui định khác.

## 9.3 Tăng sinh

### 9.3.1 Tiến tăng sinh không chọn lọc

Ủ ấm các bình tam giác đã chuẩn bị theo 9.2.2 đến 9.2.8 trong tủ ấm (6.3) đặt ở 37 °C trong 16 giờ đến 20 giờ.

### 9.3.2 Tăng sinh chọn lọc

9.3.2.1 Cho 0,1 ml dịch cấy thu được trong 9.3.1 vào ống cấy (6.9) có chứa 10 ml môi trường RVS (5.2.2). Chuyển 10 ml dịch cấy thu được trong 9.3.1 vào bình tam giác (6.8) có chứa 100 ml môi trường selenit/xystin (5.2.3).

9.3.2.2 Ủ môi trường RVS đã cấy (9.3.2.1) trong nồi cách thủy hoặc trong tủ ấm (6.4) đặt ở 41,5 °C trong 18 giờ đến 24 giờ. Ủ môi trường selenit/xystin đã cấy (9.3.2.1) trong tủ ấm (6.3) đặt ở 37 °C trong 18 giờ đến 24 giờ.

## 9.4 Cấy ria và đọc kết quả

**9.4.1** Dùng que cấy vòng (6.6) lấy đầy dịch cấy thu được trong môi trường RVS (9.3.2.2) (sau khi ủ ấm từ 18 giờ đến 24 giờ) cấy ria lên bề mặt một đĩa Petri lớn (6.12) chứa thạch lục sáng/đỏ phenol (5.2.4) sao cho thu được các khuẩn lạc phân lập tốt.

Nếu không có đĩa lớn thì sử dụng hai đĩa nhỏ, sử dụng cùng một que cấy vòng cấy từng đĩa một liên tiếp nhau.

Nên dùng phương pháp cấy ria sau đây khi sử dụng thạch lục sáng/đỏ phenol. Sử dụng một que cấy vòng (6.6) cho hai đĩa. Lấy một giọt nhỏ từ mép của bề mặt chất lỏng. Cấy lên cả hai đĩa theo Sơ đồ C.1 (a) và b)). Sử dụng toàn bộ đĩa, các vạch ria cần cách mép đĩa khoảng 0,5 cm. (Không đốt que cấy trên ngọn lửa hoặc không nhúng lại sau lần cấy ria thứ nhất, cũng không làm như vậy khi chuyển sang đĩa thứ hai). Chỉ khi sử dụng một đĩa lớn, thì phương pháp cấy ria này cần theo Sơ đồ C.1 a).

Thực hiện tương tự đối với môi trường đặc chọn lọc thứ hai (5.2.5) sử dụng một que cấy vòng mới và các đĩa Petri có kích cỡ thích hợp.

**9.4.2** Sử dụng dịch cấy thu được trong môi trường selenit/xystin (9.3.2.2) sau khi đã ủ ấm từ 18 giờ đến 24 giờ, lặp lại qui trình mô tả trong 9.4.1 với hai môi trường đặc chọn lọc.

**9.4.3** Ủ ấm các đĩa (các đĩa lật úp) trong tủ ấm từ 20 giờ đến 24 giờ ở 37 °C.

**9.4.4** Sau khi ủ ấm tiếp môi trường RVS và môi trường selenit/xystin trong 18 giờ đến 24 giờ, lặp lại việc cấy và qui trình ủ ấm như qui định trong 9.4.1 đến 9.4.3.

**9.4.5** Sau mỗi lần ủ ấm (9.4.3 và 9.4.4) kiểm tra các đĩa về sự có mặt các khuẩn lạc *Salmonella* điển hình. Nếu các khuẩn lạc mọc yếu và không có mặt các khuẩn lạc *Salmonella* điển hình thì ủ ấm lại các đĩa thêm 18 giờ đến 24 giờ trong tủ ấm (6.3) đặt ở 37 °C và kiểm tra lại các đĩa này về sự có mặt các khuẩn lạc *Samonella* điển hình.

**9.4.6** Trên thạch lục sáng/đỏ phenol (5.2.4), các khuẩn lạc *Salmonella* điển hình có màu hồng với vùng môi trường bao quanh đỏ tươi;

**CHÚ THÍCH** Do việc nhận biết các khuẩn lạc *Salmonella* đòi hỏi phải có nhiều kinh nghiệm, do vẻ ngoài của chúng trên các môi trường nhận diện có thể thay đổi tùy chủng hoặc tùy mẻ môi trường, nên phải chọn các khuẩn lạc nghi ngờ và khuẩn lạc điển hình để thử khẳng định.

## 9.5 Khẳng định

### 9.5.1 Chọn các khuẩn lạc để khẳng định

Để khẳng định, lấy năm khuẩn lạc điển hình hoặc có nghi ngờ từ mỗi đĩa môi trường đặc chọn lọc (9.4.1), nếu trên một đĩa có ít hơn năm khuẩn lạc điển hình hoặc nghi ngờ, thì lấy tất cả các khuẩn lạc đó đem thử khẳng định.

## 9.5.2 Ủ ấm

Cấy ria các khuẩn lạc đã chọn lên bề mặt các đĩa thạch dinh dưỡng (5.2.6) sao cho các khuẩn lạc phân lập mọc tốt. Ủ ấm các đĩa này từ 18 giờ đến 24 giờ trong tủ ấm (6.3) ở nhiệt độ 37 °C.

Sau khi ủ ấm, chọn các khuẩn lạc phân lập tốt thuần khiết để khẳng định đặc tính sinh hoá và huyết thanh.

## 9.5.3 Khẳng định đặc tính sinh hoá

### 9.5.3.1 Khái quát

Dùng que cấy để cấy các khuẩn lạc thuần khiết (9.5.2) vào môi trường qui định trong 9.5.3.2 đến 9.5.3.7.

### 9.5.3.2 Thạch đường/sắt III (5.2.7).

Cấy ria lên bề mặt nghiêng của thạch và đâm sâu vào mặt thạch. Ủ trong tủ ấm (6.3) 24 giờ đặt ở nhiệt độ 37 °C. Diễn giải sự biến đổi trong các môi trường như sau :

#### a) Cấy đâm sâu:

- màu vàng: glucoza dương tính (lên men glucoza)
- màu đỏ hoặc không đổi màu: glucoza âm tính (không lên men glucoza)
- màu đen: sinh sunfua hydro
- có bọt khí hoặc có vết nứt : sinh khí từ glucoza

#### b) Bề mặt thạch nghiêng :

- màu vàng : lactoza và/hoặc sucroza dương tính (có sử dụng lactoza và/hoặc xacaroza)
- màu đỏ hoặc không đổi màu: lactoza và sucroza âm tính (không sử dụng lactoza hoặc xacaroza)

Các *Salmonella* điển hình cho tính kiềm (màu đỏ) trên thạch nghiêng, có sinh khí và có tính axit (màu vàng), ở cột thạch, với (khoảng 90 % trường hợp) sinh sunfua hydro (làm đen thạch).

Khi *Salmonella* có lactoza dương tính được phân lập, mặt nghiêng thạch TSI sẽ có màu vàng. Do đó, việc khẳng định sơ bộ các *Salmonella* không chỉ dựa vào kết quả thử trên thạch TSI.

### 9.5.3.3 Thạch urê (5.2.8)

Cấy ria lên bề mặt nghiêng của thạch. Ủ ấm trong 24 giờ trong tủ ấm (6.3) ở nhiệt độ 37°C. Nếu phản ứng dương tính, việc phân giải urê sẽ giải phóng amoniac, làm đổi màu phenol đỏ sang màu hoa hồng và sau đó chuyển sang màu đỏ tím. Phản ứng thường xảy ra sau 2 giờ đến 4 giờ.

**9.5.3.4 Môi trường L-Lysin decarboxyl (5.2.9)**

Cấy ngay dưới bề mặt của môi trường lỏng. Ủ ấm trong 24 giờ trong tủ ấm (6.3) ở 37°C. Màu đỏ tía xuất hiện sau khi vi khuẩn sinh trưởng là phản ứng dương tính. Màu vàng là phản ứng âm tính

**9.5.3.5 Phản ứng  $\beta$ -galactosidaza (5.3.2)**

Hoà một vòng que cấy đẩy khuẩn lạc nghi ngờ vào một ống nghiệm (6.9) có 0,25 ml dung dịch muối (5.3.1). Thêm 1 giọt toluen (5.3.2.1) và lắc ống. Đặt ống nghiệm này vào nồi cách thuỷ (6.5) ở nhiệt độ 37°C và để yên vài phút. Thêm 0,25 ml thuốc thử  $\beta$ -galactosidaza và lắc đều. Đặt lại ống nghiệm vào nồi cách thuỷ để ở 37°C và để yên 24 giờ.

Có màu vàng chứng tỏ phản ứng dương tính. Phản ứng thường xảy ra sau 20 phút.

**9.5.3.6 Phản ứng Voges -Proskeuer (VP) (5.3.3)**

Hoà một vòng que cấy đẩy khuẩn lạc nghi ngờ vào hai ống nghiệm (6.9) mỗi ống nghiệm chứa 0,2 ml môi trường VP (5.3.3.1), ủ một ống ở nhiệt độ phòng và ống kia trong tủ ấm (6.3) ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Sau khi ủ ấm, thêm vào từng ống mỗi ống như sau: 2 giọt dung dịch creatin (5.3.3.2), 3 giọt dung dịch 1-naphtol trong cồn (5.3.3.3), sau đó thêm 2 giọt dung dịch kali hydroxit (5.3.3.4); lắc ống sau mỗi lần thêm từng loại thuốc thử. Việc tạo thành màu hồng đến màu đỏ tươi trong vòng 15 phút chứng tỏ phản ứng dương tính.

Cần tuân thủ nghiêm ngặt trật tự trên đây. Nếu, ví dụ: cho kali hydroxit vào trước khi dung dịch 1-naphtol trong cồn và pepton có mặt, thì kết quả có thể cho dung dịch có màu hồng nhạt mà có thể che khuất phản ứng dương tính.

**9.5.3.7 Phản ứng indol (5.3.4)**

Cấy khuẩn lạc nghi ngờ vào một ống nghiệm chứa 5 ml môi trường trypton/tryptophan (5.3.4.1). Ủ ấm 24 giờ trong tủ ấm (6.3) ở nhiệt độ 37°C. Sau khi ủ ấm, thêm 1 ml thuốc thử Kovacs (5.3.4.2).

Việc tạo thành vòng màu đỏ chứng tỏ phản ứng dương tính. Vòng màu nâu vàng chứng tỏ phản ứng âm tính.

**9.5.3.8 Giải thích từ các thử nghiệm sinh hoá**

Giải thích các kết quả theo Bảng 1.

Bảng 1 – Giải thích các kết quả

Phép thử khẳng định	Phản ứng âm tính hoặc dương tính	Phần trăm chủng <i>Salmonella</i> cho thấy có phản ứng
TSI glucoza (sinh axit) (9.5.3.2)	+	100
TSI glucoza (sinh khí) (9.5.3.2)	+	91,9
TSI lactoza (9.5.3.2)	-	99,2*
TSI sucroza (9.5.3.2)	-	99,5
TSI nitro sunfua (9.5.3.2)	+	91,6
Phản giải urê (9.5.3.3)	-	100
L-Lyxin decacboxyl (9.5.3.4)	+	94,6
Phản ứng $\beta$ -galactosidaza (9.5.3.5)	-	98,5
Phản ứng Voges - Proskauer (9.5.3.6)	-	100
Phản ứng indol (9.5.3.7)	-	98,9

\* Các *Salmonella enterica* sub sp. *arizonae* và *diarizonae* cho các phản ứng lactoza dương tính hoặc âm tính nhưng luôn luôn cho phản ứng  $\beta$ -galactosidaza dương tính. Các *Salmonella* nhóm II có thể cho phản ứng lactoza âm tính nhưng có thể cho phản ứng  $\beta$ -galactosidaza dương tính.

#### 9.5.4 Hệ thống chẩn đoán thương mại

Có thể sử dụng các bộ thử nhận dạng có bán sẵn trên thị trường để nhận dạng *Salmonella*.

#### 9.5.5 Khẳng định về huyết thanh

##### 9.5.5.1 Khái quát

Việc phát hiện sự có mặt các kháng nguyên *Salmonella* O-, Vi- và H- được tiến hành bằng phản ứng ngưng kết trên phiến kính của huyết thanh thích hợp với các khuẩn lạc thuần khiết (9.5.2) và sau khi đã loại trừ các chủng tự ngưng kết (9.5.5.2).

##### 9.5.5.2 Loại trừ các chủng tự ngưng kết

Cho một giọt dung dịch muối (5.3.1) lên một phiến kính đã rửa sạch cẩn thận. Dàn đều khuẩn lạc (9.5.2) cẩn thử nghiệm trong giọt dung dịch này sao cho thu được một thể huyền phù đục và đồng nhất. Lắc nhẹ phiến kính trong 30 giây đến 60 giây. Quan sát kết quả trên nền đen, tốt nhất nên dùng kính lúp.

Nếu các vi khuẩn vón lại thành các đơn vị ít nhiều có ngưng kết thì chủng này được coi là tự ngưng kết. Việc khẳng định huyết thanh các chủng tự ngưng kết này theo các qui trình trong 9.5.5.3, 9.5.5.4 và 9.5.5.5 là không thể thực hiện được.

**9.5.5.3 Kiểm tra kháng nguyên O-**

Sử dụng chủng khuẩn lạc thuần khiết không tự ngưng kết (9.5.5.2). Tiến hành theo 9.5.5.2 bằng cách lấy một giọt kháng huyết thanh O<sup>-</sup> (5.4) thay cho dung dịch muối (5.3.1). Sử dụng tuần tự một kháng huyết thanh đa giá hoặc đơn giá.

**9.5.5.4 Kiểm tra kháng nguyên Vi-**

Tiến hành theo 9.5.5.3, nhưng sử dụng một giọt kháng huyết thanh Vi<sup>-</sup> (5.4) thay cho dung dịch muối (5.3.1).

**9.5.5.5 Kiểm tra kháng nguyên H-**

Cấy một khuẩn lạc không tự ngưng kết thuần khiết lên thạch dinh dưỡng thể nửa đặc (5.3.5). Ủ ấm môi trường này trong tủ ấm (6.3) từ 18 giờ đến 24 giờ ở 37 °C. Dùng dịch cấy này để kiểm tra kháng nguyên H<sup>-</sup>, tiến hành theo 9.5.5.3 nhưng sử dụng một giọt kháng huyết thanh H<sup>-</sup> (5.4) thay thế cho dung dịch muối (5.3.1).

**9.5.5.6 Giải thích phản ứng huyết thanh**

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

**9.5.6 Giải thích từ các phản ứng sinh hoá và huyết thanh**

Bảng 2 cho phép nội suy từ các phép thử khẳng định (xem 9.5.3 và 9.5.5) được tiến hành trên các khuẩn lạc đã sử dụng (xem 9.5.2).

**Bảng 2 – Giải thích từ các phép thử khẳng định**

Các phản ứng sinh hóa	Tự ngưng kết	Các phản ứng huyết thanh	Giải thích
Phản ứng điển hình	Không	Kháng nguyên O <sup>-</sup> , Vi- hoặc H- dương tính	Các chủng được coi là <i>Salmonella</i>
Phản ứng điển hình	Không	Tất cả phản ứng âm tính	Có thể là <i>Salmonella</i>
Phản ứng điển hình	Có	Không thử được (xem 9.5.3.2)	
Phản ứng không điển hình	Không	Kháng nguyên O <sup>-</sup> , Vi- hoặc H- dương tính	
Phản ứng không điển hình	Không	Tất cả phản ứng âm tính	Không được coi là <i>Salmonella</i>

**9.5.7 Thử khẳng định cuối cùng**

Các chủng được coi là *Salmonella*, hoặc có thể là *Salmonella*, (xem bảng 2) phải được gửi đến một trung tâm chuẩn *Salmonella* đã được công nhận để khẳng định lần cuối. Việc gửi mẫu này phải kèm theo tất cả các thông tin cần thiết liên quan đến chủng vi khuẩn đó.



## 10 Dịch cấy để kiểm chứng

Để kiểm tra khả năng đảm bảo của môi trường tăng sinh và nhận biết sự phát triển của, cấy dịch cấy đối chứng của salmonella vừa mới được phân lập hoặc chủng *Salmonella* lấy từ Trung tâm nuôi cấy vi khuẩn đã được công nhận và phải được chuyển vào các bình kiểm chứng chứa hai loại môi trường tăng sinh (9.3.2). Tiến hành với các bình kiểm chứng cũng như đối với các dịch cấy thử nghiệm để chứng minh rằng các dịch cấy kiểm chứng dương tính được thu hồi.

## 11 Biểu thị kết quả

Theo kết quả giải thích, ghi lại sự có mặt hay không có mặt *Salmonella* trong mẫu thử xác định theo đơn vị khối lượng tính bằng gam hay thể tích, tính bằng mililit mẫu thử.

## 12 Lưu ý về an toàn

**12.1** Quy trình qui định trong tiêu chuẩn này chỉ được tiến hành trong các phòng thí nghiệm có các điều kiện thích hợp và đặt dưới sự kiểm soát của chuyên gia về vi sinh vật.

**12.2** Các qui trình này không được tiến hành trong các phòng thí nghiệm kiểm tra chất lượng, hay trong các cơ bản sản xuất hoặc chế biến thực phẩm, nơi có nguy cơ nhiễm bẩn từ môi trường.

**12.3** Phải luôn thực hiện đầy đủ các lưu ý về an toàn vi khuẩn học trong suốt thời gian tiến hành qui trình qui định trong tiêu chuẩn này. Phải đặc biệt chú ý tới việc khử trùng các trang thiết bị đã sử dụng và môi trường sau khi kiểm tra các mẫu còn nghi ngờ và trước khi loại bỏ hay tái sử dụng .

**12.3** Đặc biệt chú ý đối với phòng thử nghiệm khi sử dụng các dung dịch selenit vì tính độc tiềm tàng của chúng. Trong mọi tình huống không dùng miệng để hút pipet.

**CHÚ THÍCH** Đối với các lưu ý an toàn cụ thể, xem TCVN 6404 (ISO 7218), đặc biệt là điều 3, điều 4 và điều 7.

## 13 Báo cáo thử nghiệm

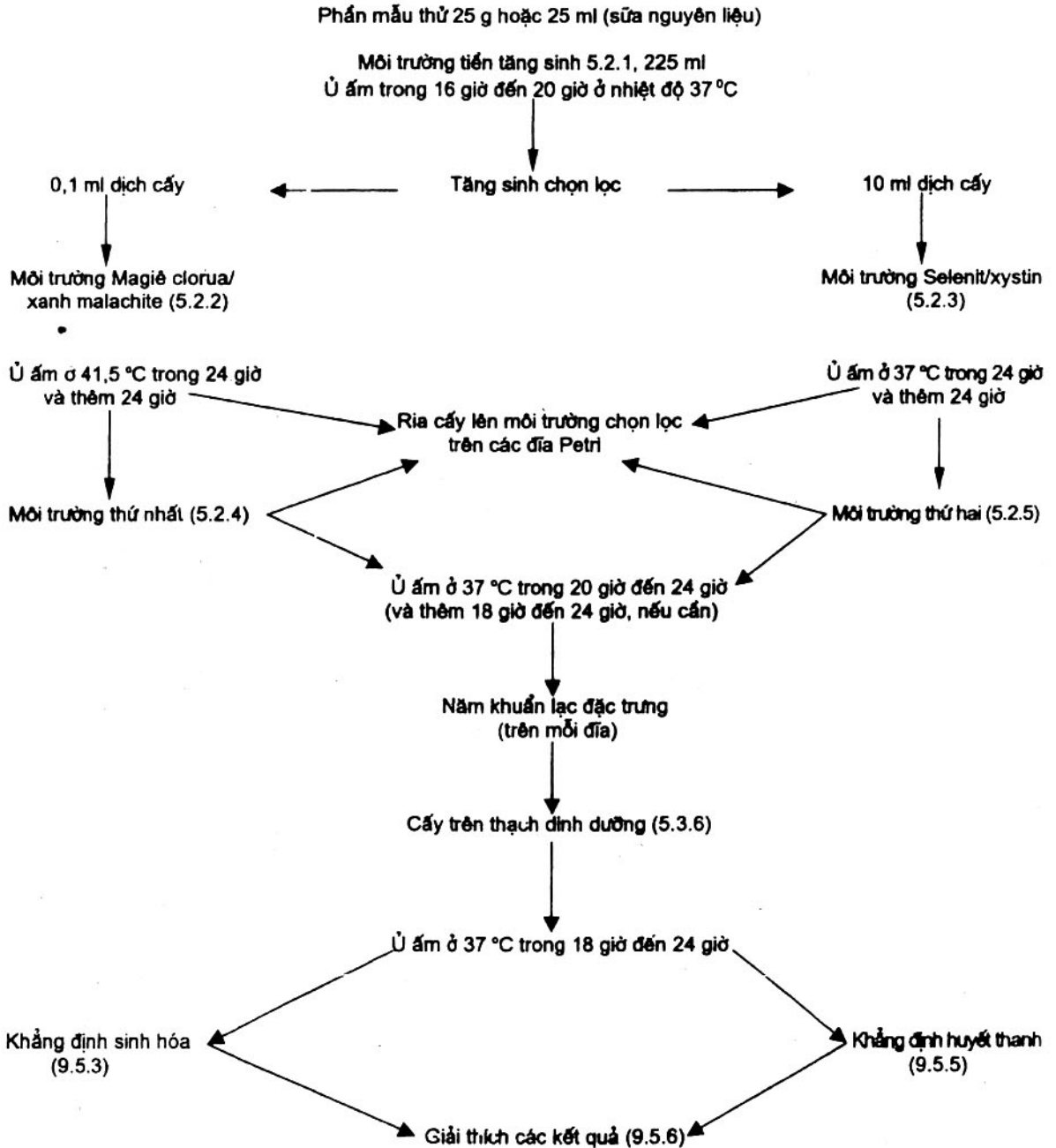
Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- mọi thông tin cần thiết về nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các điều kiện thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc được xem là tùy ý, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.
- kết quả thử nghiệm thu được hoặc nếu độ lặp lại được kiểm tra thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

## Phụ lục A

(qui định)

### Sơ đồ cách tiến hành



**Phụ lục B**

(qui định)

**Yêu cầu đối với lục sáng****B.1 Đặc tính vi khuẩn học**

Hạn chế việc phân tán vi khuẩn *Proteus* lên môi trường thạch lục sáng/đỏ phenol (5.2.4) khi việc phát triển của *Salmonella* không bị ức chế.

**B.2 Phương pháp thử****B.2.1 Môi trường**

Chuẩn bị các đĩa thạch lục sáng/đỏ phenol theo 5.2.4 nhưng có các nồng độ của lục sáng khác nhau trong phạm vi từ 4,5 mg/l đến 6 mg/l.

**B.2.2 Cách tiến hành**

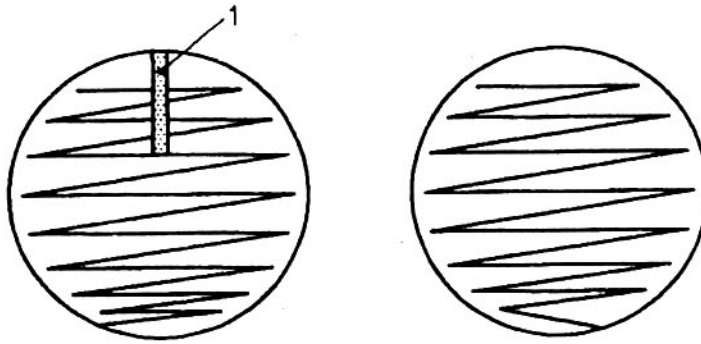
Cấy khuẩn lạc thuần khiết *Proteus* và khuẩn lạc *Salmonella* thuần khiết lên các đĩa thạch có các nồng độ lục sáng khác nhau và để các đĩa này trong tủ ấm (6.3) ở 37°C không quá 24 giờ.

Nồng độ lục sáng thích hợp cho *Salmonella* phát triển thành các khuẩn lạc màu hồng điển hình có đường kính từ 1 mm đến 2 mm, còn hạn chế việc phát triển *Proteus*, tức là loại này không mọc lan rộng. Nên dùng nồng độ lục sáng này để chuẩn bị dung dịch lục sáng (xem 5.2.4.3).

**Phụ lục C**

(tham khảo)

**Phương pháp ría cây chuẩn lên các đĩa thạch**



**Chú giải**

1 Vạch chính

**a) Đĩa thứ nhất**

**b) Đĩa thứ hai**

**Hình C.1**

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), **Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.**
  - [2] TCVN 6404 (ISO 7218), **Vi sinh vật học trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Các nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.**
-