

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 7850:2008
ISO/TS 22964:2006**

Xuất bản lần 1

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA – PHÁT HIỆN
*ENTEROBACTER SAKAZAKII***

Milk and milk products – Detection of Enterobacter sakazakii

HÀ NỘI - 2008

Lời nói đầu

TCVN 7850:2008 hoàn toàn tương đương với ISO 22964:2006;

TCVN 7850:2008 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

3.2

Enterobacter sakazakii (*Enterobacter sakazakii*)

Vi sinh vật hình thành các khuẩn lạc điển hình trên thạch phân lập sinh màu và có màu vàng trên thạch đậu tương trypton và cho thấy có các đặc tính sinh hoá theo mô tả, khi các phép thử được tiến hành theo tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc (xem thêm phụ lục A)

4.1 Tiến tăng sinh trong môi trường lỏng không chọn lọc

Cấy phần mẫu thử vào môi trường tiến tăng sinh và ủ ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 16 h đến 20 h.

4.2 Tăng sinh trong môi trường lỏng chọn lọc

Cấy dịch cấy thu được trong 4.1 vào môi trường tăng sinh chọn lọc và ủ ở $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 22 h đến 26 h.

4.3 Đổ đĩa và nhận dạng

Cấy dịch cấy tăng sinh thu được trong 4.2 vào thạch sinh màu và ủ ở $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 22 h đến 26 h.

4.4 Khẳng định

Các khuẩn lạc điển hình được chọn từ thạch sinh màu và các khuẩn lạc phân lập nhuộm màu vàng trên thạch đậu tương trypton được khẳng định bằng phép thử sinh hoá.

5 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

5.1 Khái quát

Chỉ sử dụng các thuốc thử thuộc loại phân tích, nước được sử dụng phải là nước cất, nước đã loại khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có qui định khác. Nước được sử dụng không được chứa các chất gây ức chế sự phát triển của vi sinh vật trong các điều kiện thử nghiệm của tiêu chuẩn này. Xem thêm TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) và TCVN 6263 (ISO 8261).

Để tăng độ tái lập của các kết quả, nên sử dụng các thành phần cơ bản khô hoặc môi trường hoàn chỉnh khô để chuẩn bị môi trường nuôi cấy. Trong trường hợp đó, tuân thủ nghiêm ngặt các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Xem thêm TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

Các giá trị pH được qui về nhiệt độ $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dùng axit clohydric [$c(\text{HCl}) = 1\text{ mol/l}$] hoặc dung dịch natri hydroxit [$c(\text{NaOH}) = 1\text{ mol/l}$] để chỉnh pH, nếu cần.

Môi trường nuôi cấy và thuốc thử đã chuẩn bị nếu chưa sử dụng ngay thì phải được bảo quản trong các điều kiện không làm thay đổi thành phần của chúng, nơi tối, ở nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C không quá 1 tháng, trừ khi có qui định khác.

5.2 Môi trường nuôi cấy

5.2.1 Nước đệm pepton (BPW)

5.2.1.1 Thành phần

| | |
|---|----------|
| Dịch thủy phân casein bằng emzym | 10,0 g |
| Natri clorua (NaCl) | 5,0 g |
| Natri hydro phosphat ngậm mười hai phân tử nước ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) | 9,0 g |
| Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4) | 1,5 g |
| Nước | 1 000 ml |

5.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan từng thành phần trong nước, bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH đến $7,0 \pm 0,2$ ở 25 °C, nếu cần. Phân phối dung dịch BPW vào các bình cầu hoặc ống nghiệm theo nhu cầu phân tích. Khử trùng 15 min ở 121 °C.

5.2.2 Canh thang tryptoza lauryl sulfat cải biến (mLST)/môi trường vancomyxin

5.2.2.1 Canh thang tryptoza lauryl sulfat cải biến (mLST)

5.2.2.1.1 Thành phần

| | |
|--|----------|
| Natri clorua (NaCl) | 34,0 g |
| Dịch thủy phân mô động vật và thực vật bằng emzym | 20,0 g |
| Lactoza ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) | 5,0 g |
| Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4) | 2,75 g |
| Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4) | 2,75 g |
| Natri lauryl sulfat ($\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NaO}_5\text{S}$) | 0,1 g |
| Nước | 1 000 ml |

5.2.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan từng thành phần trong nước, bằng cách đun nóng, nếu cần.

TCVN 7850:2008

Chỉnh pH đến $6,8 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần. Phân phối 10 ml mLST vào các ống nghiệm có kích thước 18 mm x 160 mm.

Khử trùng các ống nghiệm 15 min ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.2.2 Dung dịch vancomycin

5.2.2.2.1 Thành phần

| | |
|------------|-------|
| Vancomycin | 10 mg |
| Nước | 10 ml |

5.2.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan vancomycin trong nước cất. Trộn và lọc để khử trùng.

Dung dịch vancomycin có thể bền 15 ngày khi được bảo quản ở nhiệt độ từ $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.2.3 Môi trường vancomycin/mLST

Cho 0,1 ml dung dịch vancomycin (5.2.2.2.2) vào 10 ml dung dịch mLST (5.2.2.1.2) để thu được nồng độ vancomycin cuối cùng là $10\text{ }\mu\text{g}$ trên mililit mLST.

Môi trường vancomycin/mLST hoàn chỉnh có thể bền đến 1 ngày khi được bảo quản ở nhiệt độ từ $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.3 Thạch phân lập *Enterobacter sakazakii* (ESIA™)¹⁾

5.2.3.1 Thành phần

| | |
|--|-----------------------------------|
| Pepton pancreatic của casein | 7,0 g |
| Dịch chiết nấm men | 3,0 g |
| Natri clorua (NaCl) | 5,0 g |
| Natri desoxycholat | 0,6 g |
| 5-Bromo-4-cloro-3-indolyl α -D-glucopyranosit ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{BrClNO}_6$) | 0,15 g |
| Tím tinh thể | 2 mg |
| Thạch | Từ 12,0 g đến 18,0 g ^a |
| Nước | 1 000 ml |

^a Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

¹⁾ ESIA™ là tên thương mại của sản phẩm do Phòng thử nghiệm AES, Rue Maryse Bastie, Ker Lann, F-35172 Bruz (FR) cung cấp. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và tổ chức ISO/IDF không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương đương nếu cho các kết quả tương tự.

5.2.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan từng thành phần trong nước bằng cách đun sôi. Chính pH đến $7,0 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần. Khử trùng 15 min ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Làm nguội đến nhiệt độ từ $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $47\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rót khoảng 15 ml môi trường ESIA™ vào các đĩa Petri vô trùng và để cho đông đặc trên mặt phẳng nằm ngang, mát.

Môi trường này có thể bền đến 14 ngày khi bảo quản ở nhiệt độ từ $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.4 Thạch đậu tương trypton (TSA)

5.2.4.1 Thành phần

| | |
|--|----------------------------------|
| Dịch thủy phân casein bằng enzym | 15,0 g |
| Dịch thủy phân đậu tương bằng enzym | 5,0 g |
| Natri clorua (NaCl) | 5,0 g |
| Thạch | từ 9,0 g đến 18,0 g ^a |
| Nước | 1 000 ml |
| ^a Tùy vào sức đông của thạch. | |

5.2.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan từng thành phần trong nước bằng cách đun sôi. Chính pH đến $7,3 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần. Khử trùng 15 min ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. Làm nguội đến nhiệt độ từ $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $47\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rót khoảng 15 ml môi trường TSA vào các đĩa Petri vô trùng và để cho đông đặc trên mặt phẳng nằm ngang, mát.

5.2.5 Môi trường và thuốc thử về đặc tính sinh hoá

5.2.5.1 Thuốc thử phát hiện oxidaza

5.2.5.1.1 Thành phần

| | |
|--|--------|
| <i>N,N,N',N'</i> -Tetrametyl- <i>p</i> -phenylenđiamin dihydro clorua ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$) | 1,0 g |
| Nước | 100 ml |

5.2.5.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan thành phần trên trong nước ngay trước khi sử dụng.

5.2.5.2 Môi trường L-lysin tách nhóm carboxyl (decarboxylation)**5.2.5.2.1 Thành phần**

| | |
|---|----------|
| L-lysin monohydroclorua ($C_6H_{14}N_2O_2.HCl$) | 5,0 g |
| Dịch chiết nấm men | 3,0 g |
| Glucosa ($C_6H_{12}O_6$) | 1,0 g |
| Bromocresol tía | 0,015 g |
| Nước | 1 000 ml |

5.2.5.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan từng thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là $6,8 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^\circ\text{C}$. Phân phối 5 ml môi trường L-lysin decarboxylation sang các ống nghiệm có kích thước 18 mm x 160 mm.

Khử trùng các ống nghiệm này 15 min ở nhiệt độ $121\text{ }^\circ\text{C}$.

5.2.5.3 Môi trường L-Ornithin tách nhóm carboxyl (decarboxylation)**5.2.5.3.1 Thành phần**

| | |
|--|----------|
| L-Ornithin monohydroclorua ($C_5H_{12}N_2O_2.HCl$) | 5,0 g |
| Dịch chiết nấm men | 3,0 g |
| Glucosa ($C_6H_{12}O_6$) | 1,0 g |
| Bromocresol tía | 0,015 g |
| Nước | 1 000 ml |

5.2.5.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan từng thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là $6,8 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^\circ\text{C}$.

Phân phối 5 ml môi trường L-ornithin decarboxylation sang các ống nghiệm có kích thước 18 mm x 160 mm. Khử trùng các ống đựng môi trường này 15 min ở nhiệt độ $121\text{ }^\circ\text{C}$.

5.2.5.4 Môi trường L-Arginin cộng hai hydro (dihydrolation)

5.2.5.4.1 Thành phần

| | |
|--|----------|
| L-Arginin monohydro clorua ($C_6H_{14}N_4O_2.HCl$) | 5,0 g |
| Dịch chiết nấm men | 3,0 g |
| Glucoza ($C_6H_{12}O_6$) | 1,0 g |
| Bromocresol tía | 0,015 g |
| Nước | 1 000 ml |

5.2.5.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan từng thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là $6,8 \pm 0,2$ ở $25^\circ C$.

Phân phối 5 ml môi trường L-Arginin dihydrolation này sang các ống nghiệm có kích thước 18 mm x 160 mm. Khử trùng các ống đựng môi trường này 15 min ở nhiệt độ $121^\circ C$.

5.2.5.5 Môi trường để lên men hydrat cacbon (nước pepton có đỏ phenol, D-sorbitol, L-rhamnoza, D-sucroza, D-melibioza và amygdalin)

5.2.5.5.1 Môi trường cơ bản

5.2.5.5.1.1 Thành phần

| | |
|----------------------------------|----------|
| Dịch thuỷ phân casein bằng enzym | 10 g |
| Natri clorua (NaCl) | 5 g |
| Đỏ phenol | 0,02 g |
| Nước | 1 000 ml |

5.2.5.5.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan từng thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là $6,8 \pm 0,2$ ở $25^\circ C$.

Phân phối môi trường cơ bản này sang các bình cầu có dung tích thích hợp. Khử trùng môi trường này 15 min ở nhiệt độ $121^\circ C$.

5.2.5.5.2 Dung dịch hydrat cacbon (D-sorbitol, L-rhamnoza, D-sucroza, D-melibioza và amygdalin), 80 mg/ml.

TCVN 7850:2008

5.2.5.5.2.1 /Thành phần

| | |
|---------------|--------|
| Hydrat cacbon | 8 g |
| Nước | 100 ml |

5.2.5.5.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan riêng rẽ bốn thành phần hydrat cacbon trong nước để thu được bốn dung dịch hydrat cacbon. Lọc để khử trùng.

5.2.5.5.3 Môi trường lên men hydrat cacbon hoàn chỉnh

5.2.5.5.3.1 Thành phần

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Môi trường cơ bản (5.2.5.5.1) | 875 ml |
| Dung dịch hydrat cacbon (5.2.5.5.2) | 125 ml |

5.2.5.5.3.2 Chuẩn bị

Đối với từng loại hydrat cacbon, thêm dung dịch hydrat cacbon đã chuẩn bị (5.2.5.5.2) vào môi trường cơ bản (5.2.5.5.1) một cách vô trùng và trộn. Phân phối 10 ml môi trường hoàn chỉnh của từng hydrat cacbon vào các ống nghiệm kích thước 18 mm x 160 mm.

5.2.5.6 Môi trường Simmons xitrat

5.2.5.6.1 Thành phần

| | |
|---|----------------------------------|
| Natri xitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) | 2,0 g |
| Natri clorua (NaCl) | 5,0 |
| Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4) | 1,0 g |
| Amoni dihydro phosphat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) | 1,0 g |
| Magie sulfat (MgSO_4) | 0,2 g |
| Xanh bromothymol | 0,08 g |
| Thạch | Từ 8,0 g đến 18,0 g ^a |
| Nước | 1 000 ml |

^a Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

5.2.5.6.2 Chuẩn bị

Hoà tan từng thành phần trên hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là $6,8 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Phân phối 10 ml môi trường Simmons xitrat này sang các ống nghiệm (6.7) có kích thước 18 mm x 160 mm. Khử trùng các ống đựng môi trường này 15 min ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Để nghiêng các ống sao cho có được 2,5 cm chiều sâu.

6 Thiết bị, dụng cụ thuỷ tinh

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

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh thông thường và cụ thể như sau:

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

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.2 Pipet xả hết, dung tích danh định 1 ml.

6.3 Nồi cách thuỷ, có thể duy trì nhiệt độ ở $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.4 Đĩa Petri, bằng thuỷ tinh hoặc chất dẻo, đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

6.5 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ và $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ tương ứng.

6.6 Vòng cấy, bằng platin-iridi hoặc niken-crom, đường kính 3 mm hoặc vòng cấy sử dụng một lần.

6.7 Ống nghiệm, đường kính 18 mm và dài 160 mm (có nút đậy hoặc nắp vặn).

6.8 Máy đo pH, có thể đo chính xác đến 0,1 đơn vị pH ở nhiệt độ $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm đúng là mẫu đại diện và không bị thay đổi hoặc suy giảm chất lượng trong quá trình bảo quản và vận chuyển.

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

8 Chuẩn bị mẫu thử

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

9 Cách tiến hành (xem sơ đồ trong Phụ lục A)

9.1 Phần mẫu thử

Để chuẩn bị dịch pha loãng ban đầu, lấy một lượng x g phần mẫu thử (điều 8) cho vào môi trường tiên tăng sinh (5.2) với thể tích lớn gấp chín lần, sao cho thu được tỷ lệ phần mẫu thử với môi trường tiên tăng sinh được qui định trong phương pháp này.

Để yên cho các mẫu khô tan trong dịch lỏng mà không khuấy trộn. Nếu sau 30 min mà mẫu không tan hết thì trộn nhẹ nhàng mẫu với môi trường.

9.2 Tiên tăng sinh

Ủ mẫu đã cấy trong môi trường tiên tăng sinh (9.1) ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

9.3 Tăng sinh chọn lọc

Sau khi ủ mẫu thử được cấy trong môi trường tiên tăng sinh, chuyển 0,1 ml dịch cấy thu được (9.2) vào 10 ml môi trường vancomycin/mLST (5.2.2.3). Ủ ở $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Nên sử dụng nồi cách thủy (6.3) hoặc tủ ấm khí cưỡng bức để đảm bảo rằng nhiệt độ tối đa ($44,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) không bị vượt quá.

9.4 Phân lập *Enterobacter sakazakii* giả định

Sau khi ủ môi trường vancomycin/mLST đã cấy (9.3), ria cấy một vòng đáy (khoảng $10\text{ }\mu\text{l}$) lên bề mặt đĩa thạch phân lập *Enterobacter sakazakii* (5.2.3.2). Ủ đĩa ở $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Sau khi ủ, kiểm tra đĩa thạch sinh màu về sự có mặt hay không có mặt các khuẩn lạc điển hình của *Enterobacter sakazakii* giả định.

CHÚ THÍCH Các khuẩn lạc điển hình có màu xanh lá cây đến xanh lục, cỡ nhỏ đến trung bình (1 mm đến 3 mm). Các khuẩn lạc không điển hình thường hơi trong suốt và có màu tím.

9.5 Khẳng định

9.5.1 Sinh sắc tố vàng

9.5.1.1 Chọn khuẩn lạc

Chọn từ 1 khuẩn lạc đến 5 khuẩn lạc *Enterobacter sakazakii* giả định điển hình đã kiểm tra trên đĩa thạch sinh màu đã ủ (9.4).

9.5.1.2 Ủ

Cấy vạch các khuẩn lạc đã chọn (9.5.1.1) lên bề mặt đĩa thạch TSA (5.2.4.2) sao cho sau khi ủ quan sát được các khuẩn lạc tách biệt. Ủ đĩa này ở $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ từ 44 h đến 48 h. Sau khi ủ, kiểm tra các đĩa TSA về sự có mặt các khuẩn lạc màu vàng.

Khi chỉ có một khuẩn lạc được chọn (9.5.1.1) và được chuyển sang đĩa thạch TSA và sau khi ủ không thấy có khuẩn lạc màu vàng, thì chọn thêm bốn khuẩn lạc điển hình (9.5.1.1) và tiến hành theo 9.5.1.2. Nếu có ít hơn năm khuẩn lạc điển hình thì chọn tất cả chúng.

CHÚ Ý – Một vài chủng đặc biệt của *Enterobacter sakazakii* có thể không sinh màu vàng trong các điều kiện thử nghiệm qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc mất sắc tố do cấy truyền. Trong các trường hợp đó, khi sử dụng phương pháp này thì các chủng như thế có thể bị bỏ sót.

9.5.2 Kháng định bằng sinh hoá

9.5.2.1 Khái quát

Có thể sử dụng các bộ kit thử nhỏ có bán sẵn trên thị trường để nhận dạng bằng sinh hoá để nhận dạng *Enterobacter sakazakii*.

9.5.2.2 Chọn các khuẩn lạc

Chọn một khuẩn lạc màu vàng từ mỗi đĩa thạch đậu tương trypton (9.5.1.2) để nhận dạng tiếp bằng sinh hoá theo 9.5.2.3 đến 9.5.2.8.

9.5.2.3 Phép thử oxidaza

Dùng kim cấy sử dụng một lần hoặc que cấy bằng thuỷ tinh, lấy một phần của mỗi khuẩn lạc đặc trưng đã chọn (9.5.2.2).

Ria cấy lên giấy lọc được làm ẩm bằng thuốc thử oxidaza (5.2.5.1) hoặc lên đĩa bán sẵn. Không sử dụng vòng cấy hoặc que cấy bằng niken/crom.

Nếu màu của giấy lọc không đổi sang màu tím hoa cà, màu tím hoặc màu xanh đậm trong 10 s thì phản ứng được coi là âm tính.

9.5.2.4 Phép thử decarboxylaza L-Lysin

Dùng vòng cấy, que cấy hoặc đĩa thủy tinh lấy từng khuẩn lạc đã chọn (9.5.2.2) cấy vào ngay dưới bề mặt môi trường lỏng L-Lysin decarboxylation (5.2.5.2). Ủ các ống này ở $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ từ $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Sau khi ủ có màu tím chứng tỏ phản ứng dương tính. Màu vàng chứng tỏ âm tính.

9.5.2.5 Phép thử decarboxylaza L-Ornithin

Dùng vòng cấy, que cấy hoặc đĩa thủy tinh lấy từng khuẩn lạc đã chọn (9.5.2.2) cấy vào ngay dưới bề mặt môi trường lỏng decarboxylaza L-Ornithin (5.2.5.3). Ủ các ống này ở $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ từ $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Sau khi ủ có màu tím chứng tỏ phản ứng dương tính. Màu vàng chứng tỏ âm tính.

9.5.2.6 Phép thử dihydrolaza L-Arginin

Dùng vòng cấy, que cấy hoặc đĩa thủy tinh lấy từng khuẩn lạc đã chọn (9.5.2.2) cấy vào ngay dưới bề mặt môi trường lỏng dihydrolaza L-Arginin (5.2.5.4). Ủ các ống này ở $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ từ $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Sau khi ủ có màu tím chứng tỏ phản ứng dương tính. Màu vàng chứng tỏ âm tính.

9.5.2.7 Phép thử lên men các loại đường khác nhau

Dùng vòng cấy, que cấy hoặc đĩa thủy tinh lấy từng khuẩn lạc đã chọn (9.5.2.2) cấy vào ngay dưới bề mặt môi trường lỏng lên men hydrat cacbon (5.2.5.5.3). Ủ các ống này ở $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ từ $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Sau khi ủ có màu vàng chứng tỏ phản ứng dương tính. Màu đỏ chứng tỏ âm tính.

9.5.2.8 Phép thử sử dụng xitrat

Dùng vòng cấy, que cấy hoặc đĩa thủy tinh lấy từng khuẩn lạc đã chọn (9.5.2.2) cấy lên bề mặt nghiêng của môi trường Simmons xitrat (5.2.5.6). Ủ các ống này ở $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ từ $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Sau khi ủ môi trường chuyển sang màu xanh chứng tỏ phản ứng dương tính.

9.6 Diễn giải các kết quả của phép thử khẳng định

Diễn giải các kết quả theo Bảng 1.

Bảng 1 – Diễn giải các kết quả

| Phép thử khẳng định | Phản ứng dương tính hoặc âm tính | Phần trăm chủng <i>Enterobacter sakazakii</i> cho phản ứng |
|--------------------------|----------------------------------|--|
| Sinh màu vàng | + | > 99 |
| Oxidaza | - | > 99 |
| Decarboxylaza L-Lysin | - | > 99 |
| Decarboxylaza L-Ornithin | + | ± 90 |
| Dihydrolaza L-Arginin | + | > 99 |
| Axit sinh ra từ việc | | |
| - lên men D-sorbitol | - | ± 95 |
| - lên men L-rhamnoza | + | > 99 |
| - lên men D-sucroza | + | > 99 |
| - lên men D-melibioza | + | > 99 |
| - lên men amygdalin | + | > 99 |
| - thủy phân xitrat | + | > 95 |

10 Chứng kiểm chứng

Để kiểm tra khả năng của môi trường tăng sinh và môi trường phân lập giúp cho việc phát triển của *Enterobacter sakazakii*, đưa chủng ở mức thấp của chủng cấy đối chứng *Enterobacter sakazakii* vừa mới phân lập, hoặc của chủng đối chứng từ trung tâm lưu giữ dịch cấy được công nhận, cho vào các bình kiểm chứng đựng môi trường tiên tăng sinh (9.2). Tiến hành đối với các bình kiểm chứng như đã thực hiện đối với dịch cấy thử nghiệm để chứng minh rằng chủng kiểm chứng dương tính đã thu hồi được.

11 Biểu thị kết quả

Báo cáo có mặt hay không có mặt *Enterobacter sakazakii* giả định trong phần mẫu thử, theo diễn giải kết quả. Trong trường hợp này không khẳng định *Enterobacter sakazakii* giả định đã tìm thấy trên đĩa sinh màu.

Sau khi một hoặc nhiều *Enterobacter sakazakii* giả định thu được trong 9.4 được khẳng định bằng qui trình trong 9.5, ghi lại sự có mặt hay không có mặt *Enterobacter sakazakii* trong phần mẫu thử.

Chỉ rõ kết quả thu được cuối cùng theo khối lượng (gam) hay thể tích (mililit) của mẫu thử.

12 Báo cáo thử nghiệm

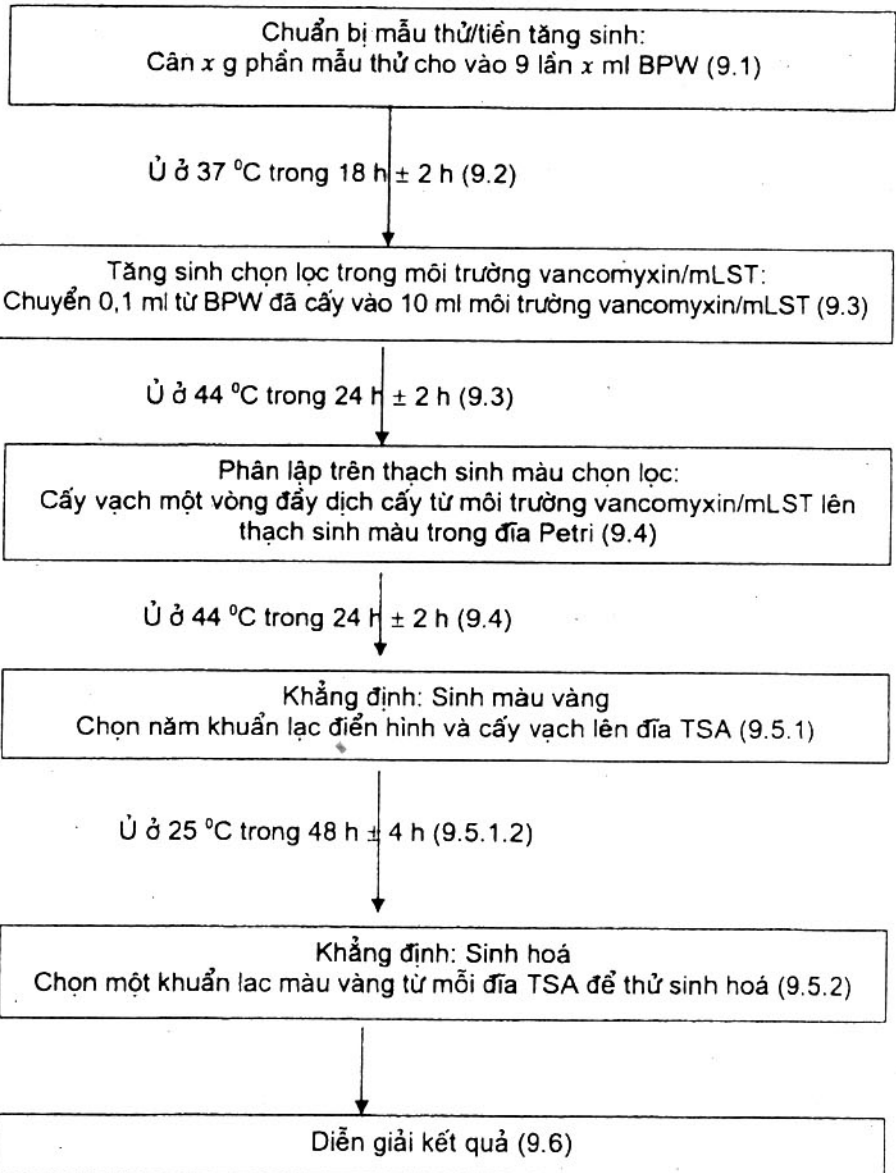
Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- 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 đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) 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;
- e) các kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A

(tham khảo)

Sơ đồ của phương pháp



Các khuẩn lạc điển hình trên thạch sinh màu có thể được coi là *Enterobacter sakazakii* giả định và ghi lại kết quả

Thư mục liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.
- [2] TCVN 6507-1 (ISO 6887-1), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật. Phần 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân.
- [3] ISO/TS 11133-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.
- [4] GULLAUME-GENTIL, O., SONNARD, V., KANDHAI, M.C., MARUGG, J.D. and JOOSTEN, H. A Simple and Rapid Cultural Method for Detection of *Enterobacter sakazakii* in Enviromental Samples. *Journal of food Protection*, **68** (1), 2005, pp. 64-69.
-