

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 10780-3:2016

ISO/TR 6579-3:2014

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG CHUỖI THỰC PHẨM -
PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN, ĐINH LƯỢNG VÀ
XÁC ĐỊNH TYP HUYẾT THANH CỦA SALMONELLA -
PHẦN 3: HƯỚNG DẪN XÁC ĐỊNH TYP HUYẾT THANH
CỦA SALMONELLA SPP**

*Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection,
enumeration and serotyping of Salmonella -
Part 3: Guidelines for serotyping of Salmonella spp*

HÀ NỘI - 2016

Lời nói đầu

TCVN 10780-3:2016 hoàn toàn tương đương với ISO/TR 6579-3:2014;

TCVN 10780-3:2016 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ tiêu chuẩn *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi* này gồm có các phần sau:

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 và Sửa đổi 1:2008* TCVN 4829:2005 (ISO 6579:2002, Amd. 1:2007) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện Salmonella spp. trên đĩa thạch – Sửa đổi 1: Phụ lục D: Phát hiện Salmonella spp. trong phân động vật và trong mẫu môi trường từ giai đoạn sản xuất ban đầu;*

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

TCVN 10780-3:2016 (ISO/TR 6579-3:2014) *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp phát hiện, định lượng và xác định typ huyết thanh của Salmonella – Phần 3: Hướng dẫn xác định typ huyết thanh của Salmonella spp.*

Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm -

Phương pháp phát hiện, định lượng và xác định typ huyết thanh của *Salmonella* -

Phần 3: Hướng dẫn xác định typ huyết thanh của *Salmonella* spp.

Microbiology of the food chain –

Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella –

Part 3: Guidelines for serotyping of Salmonella spp.

CẢNH BÁO – Để bảo vệ sức khỏe của nhân viên phòng thí nghiệm, chỉ thử nghiệm để phát hiện *Salmonella* trong phòng thử nghiệm được trang bị phù hợp, dưới sự kiểm soát của người phân tích vi sinh vật có kinh nghiệm và rất cẩn thận trong quá trình xử lý tất cả các vật liệu đã ủ.

Người sử dụng tiêu chuẩn này phải thành thạo các thao tác thông thường trong phòng thử nghiệm. Tiêu chuẩn này không đề cập đến tất cả các vấn đề an toàn, liên quan đến việc sử dụng tiêu chuẩn. Người sử dụng tiêu chuẩn phải tự thiết lập các thao tác an toàn sức khỏe thích hợp và đảm bảo tuân thủ các quy định hiện hành.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra hướng dẫn về việc xác định typ huyết thanh các serovar *Salmonella* và có thể áp dụng để xác định typ huyết thanh của các chủng cấy *Salmonella* spp. thuần khiết, phụ thuộc vào nguồn mà chúng được phân lập.

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 10780-3:2016

TCVN 6404 (ISO 7218), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật.*

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

ISO 6579-1, *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella – Part 1: Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

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

Trực khuẩn gram âm, oxidase âm tính, kỵ khí lùy ý, không sinh bào tử, thường tạo thành các khuẩn lạc đường kính từ 2 mm đến 4 mm trên môi trường đặc chọn lọc và có các đặc tính sinh hóa và huyết thanh điển hình khi phép thử được thực hiện theo tiêu chuẩn này.

3.2

Xác định typ huyết thanh *Salmonella* (serotyping of *Salmonella*)

Xác định sự có mặt hay không có mặt các kháng nguyên-O, kháng nguyên-H và kháng nguyên-Vi cụ thể trong chủng vi khuẩn phân lập đã khẳng định là *Salmonella* (3.1).

3.3

Công thức kháng nguyên (antigenic formula)

Sự kết hợp của các con số và chữ cái thể hiện các kháng nguyên O-, H- và Vi- của chủng vi khuẩn phân lập được khẳng định là *Salmonella* (3.1).

4 Nguyên tắc

Để xác định typ huyết thanh của *Salmonella* spp., các kháng nguyên sau đây được xác định cho các chủng vi khuẩn phân lập đã được khẳng định sinh hóa là *Salmonella* spp.:

Kháng nguyên-O, kháng nguyên-H và kháng nguyên-Vi.

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng các quy trình khác để khẳng định chủng vi khuẩn phân lập được là *Salmonella* spp. với điều kiện sự phù hợp của quy trình thay thế đã được xác nhận [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

5 Môi trường nuôi cấy và huyết thanh

5.1 Quy định chung

Đối với thực hành trong phòng thử nghiệm hiện tại, áp dụng TCVN 6404 (ISO 7218).

Đối với phép thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy, theo TCVN 8128 (ISO 11133).

5.2 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

Xem Phụ lục A.

5.3 Kháng huyết thanh

Kháng huyết thanh-O, Kháng huyết thanh-H và kháng huyết thanh-Vi có bán sẵn từ các nhà cung cấp khác nhau. Thông tin về các kháng huyết thanh đa giá và kháng huyết thanh đơn giá được nêu trong Phụ lục B.

6 Thiết bị, dụng cụ

Có thể sử dụng các dụng cụ thủy tinh dùng một lần để thay cho các dụng cụ dùng nhiều lần, nếu chúng có các quy định kỹ thuật tương tự.

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

6.1 Tủ ấm, để nuôi cấy và phân lập *Salmonella*, có khả năng duy trì nhiệt độ trong khoảng từ 34 °C đến 38 °C.

CHÚ THÍCH: Trong tiêu chuẩn này, nhiệt độ ủ không phải là một thông số tới hạn. Các chủng phân lập được nuôi cấy để thu được đầy đủ sinh khối vi khuẩn thuần khiết, để thực hiện các phép thử. Vì vậy, bước nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ phát triển tối ưu. Đối với *Salmonella* nhiệt độ thường từ 34 °C đến 38 °C.

6.2 Tủ sấy (để khử trùng khô) hoặc **nồi hấp** (để khử trùng ướt). Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.3 Tủ lạnh (để bảo quản môi trường nuôi cấy đã chuẩn bị), có khả năng duy trì nhiệt độ ở 5 °C ± 3 °C.

6.4 Lam kính.

6.5 Dụng cụ cấy vô trùng, ví dụ kim cấy, que cấy hoặc vòng cấy (ví dụ 1 µl).

6.6 Ống nghiệm và bình cầu vô trùng, có dung tích thích hợp. Có thể sử dụng bình hoặc chai và ống nghiệm có nắp bằng kim loại hoặc bằng chất dẻo (nắp vặn) không độc.

6.7 Đĩa Petri vô trùng, có đường kính khoảng 55 mm đến 90 mm.

TCVN 10780-3:2016

6.8 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì nhiệt độ ở 47 °C đến 50 °C.

6.9 Nồi cách thủy (hoặc tủ ấm), có khả năng duy trì nhiệt độ ở 50 °C ± 2 °C.

7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là phòng thử nghiệm làm việc với chủng cấy thuần khiết đã được khẳng định sinh hóa là *Salmonella* spp.

8 Phân loại *Salmonella*

8.1 Tổng quan

Cứ khoảng 7 năm, Trung tâm nghiên cứu về chuẩn *Salmonella* của WHO (Viện Pasteur, Paris) sẽ công bố bản cập nhật về "Công thức kháng nguyên của các serovar *Salmonella*", đó là cơ sở để định danh các tên typ huyết thanh serovar và công thức đối với các chủng vi khuẩn phân lập *Salmonella* spp. Thời điểm công bố phiên bản mới nhất của sơ đồ White-Kauffmann-Le Minor là năm 2007 (Tài liệu tham khảo [9]).

CHÚ THÍCH: Những bổ sung cho sơ đồ White-Kauffmann-Le- Minor đã được công bố trong cuốn *Nghiên cứu Vi sinh*, là một ấn phẩm của Viện Pasteur (trước đây gọi là *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*). Ví dụ, bổ sung số 47 đã được công bố năm 2010 và đưa ra các serovar mới đã phát hiện từ năm 2003 đến năm 2007 (Tài liệu tham khảo [10]).

Tiêu chuẩn này đưa ra hướng dẫn về xác định typ huyết thanh của các serovar *Salmonella*.

8.2 Danh pháp (cách đặt tên)

Các danh pháp khác nhau đã được sử dụng (hoặc vẫn đang được sử dụng) cho các chủng *Salmonella*:

- Ban đầu, Kauffmann (Tài liệu tham khảo [12]) đã coi mỗi serovar *Salmonella* là một loài riêng biệt;
- Các kiểu loài khác nhau đã được sử dụng: *S. enterica* vs. *S. choleraesuis*, mỗi loài có một chủng khác;
- Một số chủng *Salmonella* "quan trọng" (như *Salmonella* Typhi và *Salmonella* Paratyphi) được coi là các loài và không phải "chỉ" các serovar của các loài.

Hội đồng trọng tài của Tiểu ban kỹ thuật quốc tế về hệ thống tự động nghiên cứu về sinh vật nhân nguyên thủy (Prokaryotes) cho thấy rằng có thể sử dụng nhiều từ đồng nghĩa trong việc gọi tên *Salmonella* (Tài liệu tham khảo [22]). Trong tiêu chuẩn này, các tên gọi hiện tại đã được chấp nhận sử dụng rộng rãi, đã được Trung tâm nghiên cứu về chuẩn *Salmonella* của WHO [Tài liệu tham khảo 9], Hiệp hội về Vi sinh vật của Mỹ (Tài liệu tham khảo [20]), Trung tâm kiểm soát và ngăn ngừa bệnh tật

(Tài liệu tham khảo [3]) và Sổ tay *Bergey's* (Tài liệu tham khảo [17]) chấp nhận. Theo danh pháp hiện hành, các chi *Salmonella* thuộc họ *Enterobacteriaceae* và chỉ bao gồm hai loài: *S. enterica* và *S. bongori*. *S. enterica* được chia thành sáu phân loài: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* và *S. enterica* subsp. *indica*.

Các serovar *Salmonella* thuộc *S. enterica* subsp. *enterica* thường phân lập được nhiều nhất (trên 99,5 % trong số các chủng *Salmonella* phân lập được) và chúng được đặt tên, thường liên quan đến vị trí địa lý nơi serovar được phân lập lần đầu. Các serovar thuộc các phân loài khác của *S. enterica* và của *S. bongori* được đặt tên theo công thức kháng nguyên của chúng.

Do có sự kết hợp của các phân loài và nhiều serovar, nên tên đầy đủ rất dài (ví dụ: *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium). Do đó, cách gọi ngắn hơn thường sử dụng để chỉ tên của các serovar của các phân loài *enterica*. Hệ thống White-Kauffmann-Le-Minor đưa ra gợi ý các tên gọi rút gọn sau đây: *S. enterica* serovar Typhimurium hoặc *Salmonella* ser. Typhimurium. Theo Tài liệu tham khảo [3], ở trích dẫn đầu tiên của serovar trong tên chi cần theo sau là từ "serovar" viết tắt là "ser." và sau đó tên là tên của serovar. Sau đó, tên có thể được viết bằng tên chi theo sau là tên serovar (ví dụ *Salmonella* Typhimurium). Cách gọi tên serovar *Salmonella* này cũng được chấp nhận ở hầu hết các tạp chí [ví dụ: Tạp chí của Hiệp hội Vi sinh vật Mỹ (ASM)] và cũng được sử dụng trong tiêu chuẩn này.

Tóm lại, gọi tên *Salmonella* như sau:

Họ: *Enterobacteriaceae* (chữ cái đầu tiên viết hoa, chữ in nghiêng)

Chi: *Salmonella* (chữ cái đầu tiên viết hoa, chữ in nghiêng)

Loài: *enterica* (không viết hoa, chữ in nghiêng)

Phân loài: *enterica* (không viết hoa, chữ in nghiêng)

Serovar (typ huyết thanh hoặc ser.): ví dụ: Typhimurium (chữ cái đầu tiên viết hoa, không in nghiêng)

Phân loài: *salamae*
arizonae
diarizonae
houtenae
indica

Loài: *bongori*

Trong phần bổ sung cho hệ thống White-Kauffmann-Le-Minor (Tài liệu tham khảo [10]) có trên 2 600 serovar *Salmonella* được đề cập đến và số lượng được tăng đều, như thống kê trong Bảng 1.

Bảng 1 – Số lượng serovar *Salmonella* qua các năm

Loài/phân loài	Bổ sung		
	1998 ^a	2001 ^b	2007 ^c
	Số lượng serovar		
<i>Salmonella enterica</i>	2 443	2 502	2 587
subsp. <i>enterica</i>	1454	1492	1547
subsp. <i>salamae</i>	489	500	513
subsp. <i>arizonae</i>	94	95	100
subsp. <i>diarizonae</i>	324	331	341
subsp. <i>houtenae</i>	70	71	73
subsp. <i>indica</i>	12	13	13
<i>Salmonella bongori</i>	20	21	23
Tổng số serovar (chi <i>Salmonella</i>)	2 463	2 523	2 610
^a Tài liệu tham khảo [18].			
^b Tài liệu tham khảo [19].			
^c Tài liệu tham khảo [10], qua các năm 2003 đến 2007.			

8.3 Các đặc tính sinh hóa

Các loài và phân loài *Salmonella* được xác định dựa trên các phép thử sinh hóa khác nhau. Trong Bảng 2 đưa ra các đặc tính khác nhau. Xem Tài liệu tham khảo [9] và Phụ lục C để biết thêm chi tiết.

Bảng 2 – Các đặc tính sinh hóa của các loài và phân loài *Salmonella* (Tài liệu tham khảo [9])

Loài	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG ^a (2 h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+

(Bảng 2 – kết thúc)

Loài	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
Phát triển với KCN ^b	-	-	-	-	+	-	+
L(+)-tartrate ^c	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
γ -Glutamyltransferase	+ ^e	+	-	+	+	+	+
β -Glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
Mucate	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Salicin	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	-(75%)	+(75%)+	-	d	-
Dung giải bởi pha O1	+	+	-	+	-	+	d

+ $\geq 90\%$ phản ứng dương tính;
 - $\geq 90\%$ phản ứng âm tính;
 d các phản ứng khác nhau của các serovar khác nhau;
^a o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (phép thử [β -galactosidase].
^b Kali xyanua;
^c = D-Tartrat, Paratyphi B:-, Paratyphi B blovar Java:+
^e = Typhimurium:d, Dublin:-.

8.4 Đặc tính kháng nguyên

8.4.1 Yêu cầu chung

Các đặc tính kháng nguyên quan trọng của *Salmonella* đối với các phép thử huyết thanh được chia thành ba loại chính như sau:

- Kháng nguyên-O, còn gọi là kháng nguyên thân;
- Kháng nguyên-H, còn gọi là kháng nguyên lông;
- Kháng nguyên-Vi, còn gọi là kháng nguyên vỏ.

Các công thức kháng nguyên của *Salmonella* spp. gồm có ba typ kháng nguyên sau đây: kháng nguyên-O, kháng nguyên-Vi (nếu có): kháng nguyên-H của pha thứ nhất: kháng nguyên-H của pha thứ hai. Ví dụ: công thức kháng nguyên của *Salmonella* Paratyphi C là:6,7[Vi]:c:1,5, với kháng nguyên-O:6 và O:7; với kháng nguyên-Vi, có thể có mặt hoặc không có mặt (ký hiệu bởi các dấu ngoặc vuông), với kháng nguyên-H H:c của pha thứ nhất, với các kháng nguyên-H H:1 và H:5 của pha thứ hai.

8.4.2 Kháng nguyên-O (kháng nguyên thân)

Kháng nguyên này bao gồm thành phần vách tế bào và các chất chính là polysaccharid, protein và phospholipid. Kháng nguyên-O rất bền và có thể chịu được nhiệt độ đến 100 °C trong 150 min, xử lý bằng etanol 95 % thể tích hoặc axit loãng (Tài liệu tham khảo [16]).

Phản ứng của kháng nguyên-O với kháng huyết thanh làm ngưng kết hạt. Trước đây, trong tài liệu của Kauffmann-White (Tài liệu tham khảo [9]) các kháng nguyên-O được phân loại thành các nhóm kháng nguyên-O. Các nhóm này được đặt tên với chữ cái La Mã bắt đầu với nhóm A, trong đó gồm có kháng nguyên O:2 đến nhóm Z có chứa kháng nguyên O:50. Vì có nhiều các kháng nguyên-O, nên các kháng nguyên còn lại không được đưa vào nhóm, nhưng đã được đặt tên thành các kháng nguyên-O từ O:51 đến O:67. Ngày nay, mỗi nhóm O sử dụng O-yếu tố điển hình được dùng nhiều hơn. Các chữ cái này đã được giữ lại và được đưa vào trong dấu ngoặc đơn, ví dụ:O:4 [B] (Tài liệu tham khảo [9]). Trong Bảng 3 đưa ra các tên gọi cũ và mới.

**Bảng 3 – Các nhóm huyết thanh *Salmonella* (tên gọi cũ)
và các kháng nguyên-O có liên quan (tên gọi mới)**

Nhóm	Kháng nguyên-O	Nhóm	Kháng nguyên-O	Nhóm	Kháng nguyên-O
A	2	G ₁ -G ₂	13	Q	39
B	4	H	6,14	R	40
C ₁ (C ₄) ^a	6,7	I	16	S	41
C ₂ , C ₃	8	J	17	T	42
D ₁	9	K	18	U	43
D ₂	9,46	L	21	V	44
D ₃	9,46,27	M	28	W	45
E ₁ (E ₂ , E ₃) ^b	3,10	N	30	X	47
E ₄	1,3,19	O	35	Y	48
F	11	P	38	Z	50

^a C₄ đã được gộp vào C₁.

^b E₂ và E₃ đã được gộp vào E₁.

8.4.3 Kháng nguyên-H (kháng nguyên lông)

Kháng nguyên này nằm trên sợi lông và các thành phần chính là protein. Kháng nguyên này không bền bằng kháng nguyên-O, dễ bị phân hủy trong ancol, axit và nhiệt độ trên 60 °C, nhưng có khả năng chịu được dung dịch formalin 0,5 % thể tích (Tài liệu tham khảo [16]).

Phản ứng của kháng nguyên-H với kháng huyết thanh làm ngưng kết bông. Nhiều *Salmonella* spp. có hai pha kháng nguyên-H, nhưng các biến thể một pha và ba pha chưa được biết. Pha đầu tiên được gọi là pha đặc hiệu và pha thứ hai được gọi là pha không đặc hiệu. Pha đầu được ký hiệu bằng chữ thường từ a đến z. Tuy nhiên, từ khi nhận biết kháng nguyên-z, thì nhiều kháng nguyên-H mới đã được phát hiện và được đặt tên z₁, z₂, z₃...z₉₁.

Các ví dụ về các serovar một pha là:

- *Salmonella* Paratyphi A: 1,2,12:a:[1,5] với H:a đối với pha đầu tiên, trong dấu ngoặc vuông là pha thứ hai (H:1,5) có thể có mặt hoặc không có mặt;
- *Salmonella* Typhi: 9,12,[Vi]:d-; với H:d đối với pha đầu;
- *Salmonella* Derby: 1,4,[5], 12:f,g:[1,2]; với H:f,g đối với pha đầu tiên, khi đó pha thứ hai (H:1,2) có thể có hoặc không có mặt;
- *Salmonella* Enteritidis: 1,9,12:g,m;-; với H:g,m đối với pha đầu. Ngoài các H:g,m, một số chủng có thể có H:p, hoặc H:f, hoặc H:t. Các chủng đặc biệt có thể có kháng nguyên H:1,7 là pha thứ hai;
- *Salmonella* Dublin: 1,9,12,[Vi]:g,p;-; với H:g,p đối với pha đầu.

CHÚ THÍCH 1: Các yếu tố-O gạch chân được xác định bằng biến trạng thực khuẩn. Chúng chỉ có mặt nếu chủng cấy được dung giải bằng thể thực khuẩn biến trạng tương ứng (Tài liệu tham khảo [2]).

CHÚ THÍCH 2: Các yếu tố-O hoặc -H trong ngoặc vuông có thể có mặt hoặc không có mặt, mà không liên quan đến thực khuẩn thể biến trạng (Tài liệu tham khảo [2]).

CHÚ THÍCH 3: Các chủng *Salmonella* Derby và *Salmonella* Enteritidis rất hiếm gặp. Có thể cần chuyển đổi pha để phát hiện các chủng hiếm gặp này. Tuy nhiên, điều này chỉ cần thiết với những trường hợp nhất định [ví dụ trong trường hợp sai lệch nguồn và/hoặc trường hợp có di chuyển (đặc biệt)].

8.4.4 Kháng nguyên-Vi (kháng nguyên vỏ)

Kháng nguyên này là kháng nguyên vỏ và có thể che khuất các kháng nguyên-O làm cho các vi khuẩn không ngưng kết với kháng huyết thanh-O. Thành phần chính của kháng nguyên-Vi là polysaccharid. Các chủng *Salmonella* có kháng nguyên-Vi độc hơn so với các chủng không có kháng nguyên-Vi. Kháng nguyên-Vi có thể chỉ có mặt trong ba *Salmonella* serovar.

TCVN 10780-3:2016

- *Salmonella* Typhi: 9,12, [Vi]:d:-;
- *Salmonella* Paratyphi C: 6,7,[Vi]:c:1,5;
- *Salmonella* Dublin: 1,9,12, [Vi]:g,p:-.

Trong các dấu ngoặc vuông cho thấy có thể có hoặc không có mặt kháng nguyên-Vi.

CHÚ THÍCH: Sự có mặt các kháng nguyên-Vi trong các chủng phân lập của *Salmonella* từ mẫu thực phẩm hoặc mẫu thú y là rất hiếm gặp. Nếu có mặt kháng nguyên-Vi, nó sẽ che khuất các kháng nguyên-O. Để phát hiện các kháng nguyên-O, có thể cần làm nóng huyền phù mẫu phân lập (ví dụ: trong dung dịch nước muối sinh lý) ở 100 °C trong 60 min, hoặc ở 120 °C trong 15 min.

9 Quy trình xác định typ huyết thanh *Salmonella*

9.1 Yêu cầu chung

Trước khi bắt đầu xác định typ huyết thanh, cần khẳng định sinh hóa rằng chủng phân lập được thuộc chi *Salmonella* (như quy định trong ISO 6579-1). Mặc dù các kháng nguyên-H là đặc hiệu cho *Salmonella*, thì một số kháng nguyên-O thường gặp ở các chi khác nhau của *Enterobacteriaceae* (ví dụ: *Salmonella*, *Citrobacter*, *Hafnia*).

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng các quy trình khác để khẳng định rằng chủng phân lập được thuộc chi *Salmonella*, với điều kiện là quy trình thay thế này đã được xác nhận [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

Mỗi nhà cung cấp các kháng huyết thanh sản xuất ra các bộ kháng huyết thanh riêng, kèm theo hướng dẫn sử dụng. Do đó, không thể đưa ra một bộ hướng dẫn cho việc xác định typ huyết thanh, vì cần phải thực hiện theo đúng hướng dẫn của nhà cung cấp để có được kết quả tối ưu. Một số nhà sản xuất cung cấp các kháng huyết thanh (hỗn hợp của nhiều kháng huyết thanh-O hoặc kháng huyết thanh-H) rất hữu ích cho việc xác định typ huyết thanh chưa biết. Khi chủng ngưng kết với kháng huyết thanh hỗn hợp, thì có thể tiếp tục thử nghiệm với nhóm kháng huyết thanh và/hoặc chỉ với loại kháng huyết thanh hỗn hợp dương tính. Khi cần nhấn mạnh các serovar nhất định và khả năng để chỉ ra các serovar khác theo *Salmonella* spp. thì có thể tiến hành ngưng kết ngay chỉ với kháng huyết thanh đơn giá cụ thể của serovar có liên quan.

Trong Phụ lục B đưa ra quy trình chung về việc xác định typ huyết thanh chưa biết của chủng phân lập *Salmonella*.

9.2 Ví dụ về quy trình xác định typ huyết thanh cho năm serovar *Salmonella* ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng

9.2.1 Yêu cầu chung

Trong ví dụ dưới đây mô tả quy trình xác định typ huyết thanh cho năm serovar *Salmonella* ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng (xem Phụ lục D). Trong Bảng 4 đưa ra các chủng này với công thức kháng nguyên của chúng.

Trong các phần sau, mô tả việc ngưng kết các chủng phân lập *Salmonella*, quy trình này thường được thực hiện nhiều nhất. Tuy nhiên, vẫn có các quy trình khác, ví dụ: phương pháp đĩa vi giống (xem Phụ lục E).

Bảng 4 – Công thức kháng nguyên của năm serovar *Salmonella* ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng

Tên	Kháng nguyên-O ^b	Kháng nguyên-H	
		Pha 1	Pha 2
<i>Salmonella</i> Typhimurium	<u>1,4</u> ,[5]12	i	1,2
<i>Salmonella</i> Enteritidis ^a	<u>1,9</u> ,12	g,m	-
<i>Salmonella</i> Infantis	6,7, <u>14</u>	r	1,5
<i>Salmonella</i> Virchow	6,7, <u>14</u>	r	1,2
<i>Salmonella</i> Hadar	6,8	Z ₁₀	e,n,x

^a Ngoài các yếu tố H:g,m, một số chủng có thể có yếu tố H:p hoặc H:f hoặc H:t. Trừ các chủng có thể có kháng nguyên H:1,7 là pha thứ 2 (Tài liệu tham khảo [9]).

^b Các yếu tố O gạch chân được xác định bằng biến trạng thực khuẩn. Chúng chỉ có mặt nếu chúng cây được dung giải bằng thể thực khuẩn biến trạng tương ứng (Tài liệu tham khảo [9]).

9.2.2 Chọn các khuẩn lạc nghi ngờ là *Salmonella*

Cấy một khuẩn lạc từ chủng cấy thuần khiết nghi ngờ là *Salmonella* theo đặc tính sinh hóa. Sử dụng môi trường nuôi cấy và các phương pháp do nhà sản xuất quy định đối với kháng huyết thanh được sử dụng. Nếu không có sẵn thông tin, thì có thể sử dụng môi trường thạch không chọn lọc như thạch dinh dưỡng (ví dụ: xem A.2). Ủ các đĩa thạch dinh dưỡng đã cấy từ 34 °C đến 38 °C (6.1) "qua đêm" (khoảng 18 h).

9.2.3 Kiểm tra phản ứng tự ngưng kết

Ví dụ về phép thử kiểm tra phản ứng tự ngưng kết được mô tả sau đây. Có thể sử dụng các phương pháp khác. Thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

– Cho một giọt nước muối (có thể thay đổi từ NaCl 8,5 g/l đến NaCl 35 g/l, nồng độ cao hơn có thể nhạy hơn) trên lam kính (6.4).

TCVN 10780-3:2016

- Chuyển một lượng nhỏ chủng cấy vi khuẩn (ví dụ: có thể lấy một lượng 1 μ l bằng que cấy dùng một lần) sang lam kính và trộn với giọt nước muối.
- Nghiêng nhẹ lam kính qua lại. Tùy thuộc vào nhà sản xuất và/hoặc nồng độ muối, thường khoảng 5 s đến 60 s.
- Đánh giá huyền phù. Khi có mặt các hạt trong huyền phù chứng tỏ có sự tự ngưng kết. Các chủng có phản ứng dương tính trong phép thử tự ngưng kết rất khó kiểm tra thêm để xác định typ huyết thanh. Đối với các chủng tự ngưng kết, không thể thực hiện được phép thử kháng nguyên-O. Tuy nhiên, đôi khi vẫn có thể điều tra về các kháng nguyên-H.

Nếu một chủng cho thấy tự ngưng kết, có thể thử trên một hoặc hai cách dưới đây trên cùng một khuẩn lạc và/hoặc trên các khuẩn lạc khác.

- Hòa khuẩn lạc trong nước vô trùng thay vì trong dung dịch nước muối và tiến hành quy trình tự ngưng kết như trên.
- Cấy các chủng trên môi trường thạch bán đặc như môi trường thạch Rappaport Vassiliadis cải biến (MSRV) (theo quy định trong ISO 6579-1) và sử dụng khuẩn lạc từ thạch bán đặc để thực hiện quy trình tự ngưng kết như trên.

CHÚ THÍCH: Các chủng tự ngưng kết còn được gọi là các chủng "ráp".

9.2.4 Ngưng kết với kháng huyết thanh-O

Các hướng dẫn sử dụng của các kháng huyết thanh có thể khác nhau giữa các nhà sản xuất. Do đó, điều quan trọng là luôn tuân thủ các hướng dẫn của nhà sản xuất.

Hầu hết các nhà sản xuất sử dụng phương pháp ngưng kết lam kính để phát hiện các kháng nguyên-O. Trong phương pháp này, trộn một giọt huyết thanh với huyền phù vi khuẩn (trực tiếp từ đĩa, ống hoặc canh thang) trên lam kính. Nghiêng nhẹ lam kính qua lại. Sau đó, quan sát sự ngưng kết trên lam kính. Sự có mặt các hạt chứng tỏ phản ứng dương tính.

Đối với các nhà sản xuất khác nhau, có thể có những thay đổi trong cách tiến hành như sau:

- Kích thước của giọt trên lam kính (ví dụ: 25 μ l hoặc một "giọt");
- Cách trộn kháng huyết thanh với vi khuẩn trên lam kính (vi khuẩn được lấy trực tiếp từ môi trường thạch hoặc huyền phù, kháng huyết thanh được cho trực tiếp trên lam kính hay được cho vào huyền phù vi khuẩn);
- Thời gian nghiêng trượt lam kính (có thể dao động từ 5 s đến 60 s);

- Cách quan sát sự ngưng kết (phóng đại hay không, nền tối hoặc ánh sáng bình thường);
- Giải thích các kết quả (đọc các chú thích liên quan đến những hạn chế của quy trình).

9.2.5 Ngưng kết với kháng huyết thanh-H

Sau khi ngưng kết với kháng nguyên-O, tiến hành ngưng kết với kháng nguyên-H. *Salmonella* thường có hai loại kháng nguyên-H (pha 1 và pha 2). Nếu một pha-H được tìm thấy âm tính với các chủng hai pha, thì cần thực hiện phương pháp đảo pha. Pha-H chính bị khống chế bằng phương pháp đảo pha. Bằng cách khống chế pha-H chính, thì pha-H thứ hai có thể được thể hiện và xác định.

Phương pháp thường được sử dụng để đảo pha là phương pháp của Sven Gard, xem 9.2.7. Đối với việc này, kháng huyết thanh đảo pha cụ thể được cho vào môi trường thạch và chủng *Salmonella* được cấy thành điểm trên đĩa. Môi trường thạch phải đủ mềm để cho *Salmonella* di chuyển dễ dàng trong môi trường. Nồng độ thạch trong môi trường có thể thay đổi từ 0,5 % đến 1 % khối lượng (tùy thuộc vào nồng độ gel của thạch). Ví dụ sự di chuyển trên bề mặt môi trường được đưa ra trong A.3. Các ví dụ khác về đảo pha được đưa ra trong Phụ lục F.

Để kiểm tra về sự ngưng kết, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

9.2.6 Phép thử ngưng kết để xác định typ huyết thanh của năm serovar *Salmonella* ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng

9.2.6.1 Yêu cầu chung

Để phát hiện năm serovar *Salmonella* đề cập trong Bảng 4, cần đến các kháng huyết thanh-O và kháng huyết thanh-H sau đây:

O:4, O:5, O:6 (O:6₁ hoặc O:6₇ hoặc O:6_{14,24}), O:7, O:8, O:9 và O:46.

H:i, H:2, H:G hoặc H:g (đơn giá), H:m, H:q, H:s, H:t, H:r, H:5, H:z₁₀ và H:x.

Để xác định các typ huyết thanh của các chủng *Salmonella* theo thứ tự nêu trong Bảng 4, thực hiện quy trình quy định trong 9.2.6.2 đến 9.2.6.5 (xem sơ đồ tại Phụ lục D).

Để biết thêm thông tin về các phép thử tuân tự các kháng nguyên khác nhau, xem Phụ lục B.

9.2.6.2 Nếu O:4 dương tính

Ngưng kết với O:5. Kết quả có thể là dương tính hay âm tính đối với *Salmonella* Typhimurium, vẫn còn có thông tin có thể liên quan đến các mục đích dịch tễ.

Ngưng kết với các kháng huyết thanh H:i và H:2 (có thể cần đảo pha).

TCVN 10780-3:2016

Các serovar là chủng Typhimurium nếu cả hai phản ứng này là dương tính.

Ngưng kết với O:12 là không cần thiết để chứng tỏ chủng phân lập *Salmonella* Typhimurium, vì O:4 dương tính chứng tỏ có mặt O:12. Tương tự, việc phát hiện kháng nguyên H:1 không có khả năng phân biệt và không cần phải kiểm tra bổ sung.

9.2.6.3 Nếu O:9 dương tính

Ngưng kết với kháng huyết thanh H:G (hỗn hợp) hoặc với kháng huyết thanh H:g (kháng thể đơn giá).

Nếu phản ứng này dương tính, tiến hành ngưng kết tiếp với kháng huyết thanh H:m.

Nếu kết quả dương tính, ngưng kết với các kháng huyết thanh H:q và H:s để kiểm chứng âm.

Nếu những phản ứng này âm tính, ngưng kết tiếp với O:46 và nếu muốn, ngưng kết tiếp với O:12. Nếu O:46 âm tính (và O:12 dương tính), thì serovar của chủng là Enteritidis.

CHÚ THÍCH: Ngoài các yếu tố H:g,m, một số chủng *Salmonella* Enteritidis có thể cho phản ứng dương tính với kháng huyết thanh H:p hoặc H:f hoặc H:t. Tuy nhiên, các chủng này là rất hiếm. Trừ các chủng đặc biệt có thể có kháng nguyên H:1,7 như là pha thứ hai.

9.2.6.4 Nếu O:7 dương tính

Ngưng kết với kháng nguyên H:r, H:2 và H:5 (có thể cần đảo pha).

Nếu H:r và H:2 dương tính, serovar của chủng là: Virchow.

Nếu H:r và H:5 dương tính, serovar của chủng là: Infantis.

Việc phát hiện kháng nguyên H:1 không có khả năng phân biệt và không cần phải kiểm tra bổ sung.

9.2.6.5 Nếu O:8 dương tính

Ngưng kết với các kháng nguyên H:z₁₀ và H:x.

Nếu cả hai đều dương tính, ngưng kết tiếp với các kháng huyết thanh O:6, hoặc O:6,7 hoặc O:6,14,24.

Nếu O:6, hoặc O:6,7 hoặc O:6,14,24 dương tính thì các serovar của chủng là:Hadar.

Một số mẻ kháng huyết thanh O:6,7 không phản ứng với chủng O:6,8. Khi mua kháng huyết thanh này, cần chắc chắn rằng có phản ứng với chủng O:6,8 (hỏi các nhà sản xuất).

CHÚ THÍCH: Dạng biến thể khuẩn lạc có thể xảy ra với các biểu hiện của kháng nguyên O:6, bởi một số serovar nhóm huyết thanh C₂ (Tài liệu tham khảo [11]). Vì lý do đó, không phải lúc nào cũng có thể nhận biết được, ví dụ *Salmonella* Hadar và *Salmonella* Istanbul như các serovar rõ ràng.

9.2.7 Ví dụ về đảo pha sử dụng phương pháp Sven Gard

Ví dụ này mô tả việc đảo pha dùng cho việc xác định typ huyết thanh *Salmonella* Typhimurium. Nhìn chung, phương pháp này cũng áp dụng được cho các serovar *Salmonella* khác.

Khi O:4 và H:i dương tính, còn H:2 âm tính, thì chuẩn bị một đĩa thạch di chuyển (xem A.3 hoặc F.1), với kháng-H:i (ví dụ: hỗn hợp huyết thanh đảo pha có chứa H:i). Chấm chủng vi khuẩn vào giữa đĩa thạch. Ủ đĩa từ 34 °C đến 38 °C (6.1) qua đêm (khoảng 18 h).

Sau khi ủ, làm lại việc ngưng kết chủng với kháng nguyên H:2.

Nếu H:2 lại âm tính, ngưng kết tiếp với H:i.

Nếu H:i âm tính hoặc có phản ứng yếu, thì chủng này không phải là *Salmonella* Typhimurium.

Nếu H:i cho phản ứng dương tính (mạnh), thì lặp lại việc đảo pha. Chuẩn bị lại đĩa thạch với kháng-H:i và lấy vi khuẩn từ điểm xa nhất mọc lan trên đĩa thạch, đảo pha thứ nhất để cấy vào đĩa thứ hai. Lặp lại quy trình đảo pha như trên.

CHÚ THÍCH 1: Đôi khi cần bổ sung kháng huyết thanh H:i vào thạch (của đĩa đảo pha lặp lại) để thu được phản ứng tốt hơn.

CHÚ THÍCH 2: Cũng có thể có các biến thể một pha của *Salmonella* Typhimurium, ví dụ do thiếu hoặc không thể hiện pha H thứ hai 1,4,[5]12:i-. Trong khi xác định typ huyết thanh biến thể này, có thể phải lặp lại một lần hoặc nhiều lần việc đảo pha để loại trừ sự có mặt của pha thứ hai. Ngoài ra, có thể sử dụng phương pháp phân tử để khẳng định có phải biến thể của *Salmonella* Typhimurium hay không.

10 Kiểm soát chất lượng

Huyết thanh được sử dụng để ngưng kết phải trong (trừ các kháng huyết thanh được sử dụng để thử nghiệm latex). Luôn luôn phải kiểm tra huyết thanh trước khi sử dụng. Trường hợp bị đục, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các quy trình kiểm soát chất lượng của quy trình xác định typ huyết thanh như sau:

- Mỗi tuần làm việc chọn hai chủng (hoặc số lượng chủng chiếm khoảng 2 % khối lượng chủng phân lập được). Mỗi chủng được cấy hai lần. Các chủng cấy chuyển được xử lý như là hai chủng mới phân lập để xác định typ huyết thanh. Sau khi hoàn thành công việc, các kết quả của hai chủng và các chủng cấy chuyển được so sánh về sự khác biệt. Nếu có bất kỳ một sự khác biệt nào, thì sẽ được nghiên cứu tiếp.
- Phòng thử nghiệm lưu giữ đầy đủ chủng gốc các serovar *Salmonella* đặc hiệu (ví dụ: từ bộ sưu tập chủng cấy hoặc từ các nghiên cứu so sánh liên phòng). Chủng lưu gốc này, định kỳ (ví dụ: hàng tuần) chọn một hoặc hai serovar của 10 serovar thường gặp nhất trong phòng thử nghiệm để kiểm tra quy trình xác định typ huyết thanh. Các serovar được sử dụng để thực hiện việc kiểm soát chất lượng có

TCVN 10780-3:2016

thể thay đổi hàng tuần để đảm bảo rằng trong một khoảng thời gian các kháng huyết thanh khác nhau đều đã được kiểm tra.

– Phải kiểm tra khả năng xác định typ huyết thanh giữa các phòng thử nghiệm khác nhau. Để thực hiện, nên thường xuyên tham gia vào các nghiên cứu so sánh liên phòng, khi có thể.

11 Báo cáo kết quả

Đối với các chủng phân lập thuộc *S. enterica* subsp. *enterica*, thì báo cáo tên (đầy đủ) và khi có thể/khi cần kèm theo công thức kháng nguyên. Đối với các loài (phân loài) khác, thì báo cáo công thức kháng nguyên tìm thấy được.

Các ký hiệu của các công thức kháng nguyên là như sau:

Kháng nguyên-O (cách nhau bằng dấu phẩy), kháng nguyên-Vi (nếu có): các kháng nguyên-H của pha đầu tiên (cách nhau bằng dấu phẩy); các kháng nguyên-H của pha thứ hai (nếu có; cách bằng dấu phẩy); kháng nguyên-H của pha thứ ba (nếu có).

Ví dụ, theo hệ thống White-Kauffmann-Le-Minor (Tài liệu tham khảo [9]), công thức kháng nguyên đầy đủ của *Salmonella* Typhimurium là: 1,4,[5],12:i:1,2.

Với các kháng nguyên-O O:1,4,[5],12; trong đó yếu tố O được gạch dưới được xác định bằng thể thực khuẩn biến trạng và chỉ xuất hiện nếu chủng cấy được dung giải bằng thực khuẩn thể biến trạng tương ứng và trong dấu ngoặc vuông chỉ ra rằng có thể có hoặc không có mặt yếu tố liên quan đến thực khuẩn thể biến trạng (Tài liệu tham khảo [9]); với các kháng nguyên-H, H:i đối với pha thứ nhất và H:1,2 đối với pha thứ hai.

Để báo cáo chính thức, công thức kháng nguyên của chủng phân lập, tốt nhất là không có ngoặc vuông hoặc không có gạch dưới. Báo cáo công thức kháng nguyên đã được xác định, ví dụ 4,12:i:1,2.

Đối với các phân loài khác của *S. enterica*, loài có serovar phù hợp được thể hiện bằng ký hiệu sau đây (Tài liệu tham khảo [9]):

II đối với serovar *S. enterica* subsp. *salamae*;

IIIa đối với serovar *S. enterica* subsp. *arizonae*;

IIIb đối với serovar *S. enterica* subsp. *diarizonae*;

IV đối với serovar *S. enterica* subsp. *houtenae*;

VI đối với serovar *S. enterica* subsp. *indica*.

Ví dụ về báo cáo kết quả của các loài khác với *S. enterica* subsp. *enterica* là S. II 30:z₁₀:e,n,x,z₁₅.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Thành phần và chuẩn bị môi trường nuôi cấy và thuốc thử

A.1 Yêu cầu chung

Trong Phụ lục này đưa ra các môi trường nuôi cấy liên quan đến các phép thử sinh hóa (xem Phụ lục C). Thành phần của các môi trường nuôi cấy nêu trong phụ lục này được lấy làm ví dụ. Môi trường nuôi cấy có các tên gọi tương tự có thể được nêu trong tài liệu hoặc được bán sẵn với các thành phần hơi khác nhau. Do đó, điều quan trọng đối với mỗi phép thử sinh hóa cần kiểm tra các phản ứng của môi trường nuôi cấy với các chủng kiểm chứng dương tính và âm tính điển hình.

ĐIỀU QUAN TRỌNG – Nếu môi trường nuôi cấy hoặc thuốc thử được chuẩn bị từ môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh khô hoặc thuốc thử hoặc môi trường nuôi cấy đã chuẩn bị sẵn được sử dụng, thì thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất về chuẩn bị, điều kiện bảo quản, hạn sử dụng và cách sử dụng.

Thời hạn sử dụng của các môi trường nuôi cấy nêu trong phụ lục này đã được thể hiện trong một số tài liệu nghiên cứu. Người sử dụng cần kiểm tra xác nhận điều này trong các điều kiện bảo quản của mình [xem TCVN 8128 (ISO 11133)].

A.2 Thạch dinh dưỡng

A.2.1 Thành phần

Chất chiết từ thịt	3,0 g
Pepton ^a	5,0 g
Natri clorua (NaCl)(tùy chọn)	5,0 g
Thạch	từ 9 g đến 18 g ^b
Nước	1 000 ml

^a Ví dụ: thủy phân casein bằng enzym

^b Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

TCVN 10780-3:2016

A.2.2 Chuẩn bị

Đun nóng để hòa tan các thành phần trong nước.

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

Chuyển môi trường nuôi cấy vào bình (6.6) có dung tích thích hợp.

Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.2) ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 min.

Chuyển khoảng 20 ml môi trường đã tan chảy vào các đĩa Petri vô trùng với đường kính 90 mm (6.7).
Để cho đông đặc.

Bảo quản các đĩa đã rót (hướng lên trên), tránh hút ẩm và để ở nơi tối ở $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6.3) đến 2 tháng.

Nếu cần, làm khô các đĩa trước khi sử dụng.

A.3 Môi trường thạch - Sven Gard (ví dụ)

A.3.1 Ví dụ 1 (Tài liệu tham khảo [16])

Sử dụng thạch dinh dưỡng với nồng độ thạch cải biến

Cần xác định nồng độ thạch của thạch dinh dưỡng dùng cho đảo pha H trong đĩa Petri. Nồng độ này có thể thay đổi từ 0,5 % đến 1 % phần khối lượng, tùy thuộc vào bề thạch được sử dụng. Môi trường thạch yêu cầu phải đủ mềm cho *Salmonella* di chuyển dễ dàng trên khắp môi trường sau khi ủ qua đêm từ $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6.1). Các thử nghiệm sơ bộ, không bổ sung kháng huyết thanh, do đó cần sử dụng môi trường thạch dinh dưỡng (pH 7,4) được chuẩn bị cho mục đích đó hoặc thạch dinh dưỡng của phòng thử nghiệm thông thường, được làm bán đặc bằng cách bổ sung canh thang với tỷ lệ thích hợp để qua đêm. Thể tích cần cho một đĩa Petri 10 cm là 30 ml.

Việc di chuyển trên bề mặt thạch sẽ dễ hơn nếu bổ sung natri desoxycholate ($0,3\text{ g/l}$) vào môi trường (natri desoxycholate kích thích sự di chuyển), xem A.3.2.

A.3.2 Ví dụ 2

A.3.2.1 Thành phần

Chất chiết từ thịt	5,0 g
Chất chiết nấm men	1,0 g
Canh thang đậu tương trypto-casein	30,0 g

Glucose	1,0 g
Natri desoxycholat	0,35 g
Thạch	từ 5 g đến 9 g ^a
Nước	1 000 ml

^a Tùy thuộc vào sức đông của thạch. Có thể cần cải thiện để xác định nồng độ của thạch đối với môi trường cần thiết cho sự di chuyển tối ưu của *Salmonella*.

A.3.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần.

Chỉnh pH để sau khi khử trùng pH tương ứng là $7,6 \pm 0,2$ ở 25 °C, nếu cần.

Chuyển môi trường nuôi cấy vào bình (6.6) có dung tích thích hợp.

Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.2) được duy trì ở 110 °C trong 20 min.

Làm nguội thạch đến khoảng từ 47 °C đến 50 °C (6.8), hoặc bảo quản trong chai đậy kín ở 5 °C (6.3) đến 2 tháng.

Ngay trước khi sử dụng:

- bổ sung một giọt kháng huyết thanh có liên quan (SG1 đến SG6) vào môi trường tan chảy và trộn đều;
- rót khoảng 10 ml vào các đĩa Petri đường kính 55 mm (6.7) hoặc rót khoảng 20 ml vào các đĩa Petri đường kính 90 mm.

A.4 Canh thang malonat

A.4.1 Thành phần (Tài liệu tham khảo [14])

Amoni sulfat	2,0 g
Dikali phosphat	0,6 g
Monokali phosphat	0,4 g
Natri clorua	2,0 g
Natri malonat	3,0 g

TCVN 10780-3:2016

Bromothymol xanh	0,025 g
Nước	1 000 ml

A.4.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần.

Chỉnh pH để sau khi khử trùng pH tương ứng là $6,7 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần.

Chuyển môi trường nuôi cấy với các lượng 5 ml vào các ống cho phép có đủ oxy để xảy ra phản ứng malonat. Ví dụ, sử dụng các ống kích thước xấp xỉ 22 mm x 220 mm.

Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.2) được duy trì ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 min.

Bảo quản ở nơi tối ở $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6.3) đến 2 tháng.

A.5 Canh thang Dulcitol (Tài liệu tham khảo [2])

A.5.1 Môi trường hoàn chỉnh

A.5.1.1 Thành phần

Chất chiết từ thịt	3,0 g
Pepton ^a	10,0 g
Natri clorua	5,6 g
Chất chỉ thị Andrade (A.5.2)	10 ml
Dung dịch Dulcitol (A.5.3)	50 ml
Nước	1 000 ml

^a Ví dụ: phân giải casein bằng enzym.

A.5.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước.

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

Chuyển môi trường nuôi cấy với các lượng 5 ml vào các ống có dung tích danh nghĩa 15 ml.

Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.2) được duy trì ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 min.

Bảo quản ở nơi tối ở 5 °C (6.3) đến 2 tháng.

A.5.2 Chất chỉ thị Andrade

A.5.2.1 Thành phần (sau Andrade-Penny năm 1895; trích dẫn trong Tài liệu tham khảo [7])

Fuchsin axit	0,5 g
Natri hydroxit (1,0 mol/l):	0,5 g
Nước	100 ml

A.5.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan fuchsin trong nước, thêm natri hydroxit. Nếu sau vài giờ mà fuchsin không mất màu thì thêm 1 ml hoặc 2 ml natri hydroxit. Thuốc thử này có hạn sử dụng dài và cần chuẩn bị một lượng đủ lớn để dùng trong nhiều năm.

A.5.3 Dung dịch Dulcitol

A.5.3.1 Thành phần

Dulcitol	10 g
Nước	100 ml

A.5.3.2 Chuẩn bị

Hòa tan dulcitol trong nước.

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

Bảo quản ở 5 °C (6.3) đến 2 tháng.

A.6 Dung dịch ONPG (0,013 3 mol/l) (Tài liệu tham khảo [2])

A.6.1 Môi trường hoàn chỉnh

A.6.1.1 Thành phần

o-Nitrophenyl-D-galactoside (ONPG)	0,08 g
Dung dịch mononatri phosphat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O; A.6.2)	5 ml
Nước	15 ml

TCVN 10780-3:2016

A.6.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan ONPG trong nước ở khoảng 37 °C. Thêm dung dịch NaH_2PO_4 1,0 mol/l (A.6.2.1). Dung dịch phải không màu. Bảo quản dung dịch ở 5 °C (6.3).

Trước khi sử dụng, làm ấm một lượng thích hợp (đủ cho số lượng phép thử) dung dịch ONPG đến khoảng 37 °C.

A.6.2 Dung dịch mononatri phosphat (1,0 mol/l)

A.6.2.1 Thành phần

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6,9 g
Dung dịch NaOH, 300 g/l	3 ml
Nước	45 ml

A.6.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ trong nước. Thêm dung dịch NaOH 300 g/l và chỉnh pH đến $7,0 \pm 0,2$ (ở 25 °C). Thêm nước đến 50 ml và bảo quản dung dịch ở 5 °C (6.3) đến 2 tháng.

A.7 Canh thang D-tartrat (axit tartrat hữu cơ)

A.7.1 Thành phần

Pepton ^a	10,0 g
Kali natri (+) tartrat	10,0 g
Dung dịch bromothymol xanh, 10 g/l	2,4 ml
Nước	1 000 ml

^a Ví dụ: phân giải casein bằng enzym.

A.7.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần.

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

Chuyển môi trường nuôi cấy với các lượng 5 ml vào các ống có dung tích danh định 15 ml.

Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.2) được duy trì ở 115 °C trong 10 min.

Bảo quản ở nơi tối ở 5 °C (6.3) đến 2 tháng.

A.8 Dung dịch chỉ axetat

A.8.1 Thành phần

Chỉ axetat	khoảng 50 g
Nước	10 ml

A.8.2 Chuẩn bị

Cho nước vào chai có nắp vặn thích hợp. Bổ sung đủ lượng chỉ axetat để tạo dung dịch bão hòa (nghĩa là có thấy chỉ axetat không tan rõ trên đáy chai).

Bảo quản ở nhiệt độ phòng đến 6 tháng.

A.9 Canh thang tim-não (BHI)

A.9.1 Thành phần

Bột não	12,5 g
Bột tim bò	5,0 g
Pepton proteose	10,0 g
Glucose	2,0 g
Natri clorua	5,0 g
Dinatri phosphat	2,5 g
Nước	1 000 ml

A.9.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần.

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

Chuyển môi trường nuôi cấy với các lượng 5 ml vào các ống có dung tích danh nghĩa 15 ml.

Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.2) được duy trì ở 121 °C trong 15 min.

TCVN 10780-3:2016

Bảo quản nơi tối ở 5 °C (6.3) đến 2 tháng.

A.10 Dung dịch nước muối formal (1 % phần thể tích)

A.10.1 Thành phần

Dung dịch formaldehyd, 370 g/l	40,0 ml
Dung dịch natri clorua 170 g/l	200 ml
Nước	Lên đến 4 000 ml

A. 10.2 Chuẩn bị

Cho dung dịch formaldehyd vào dung dịch natri clorua. Thêm nước đến tổng thể tích 4 l.

A.11 Ống Craigie

A.11.1 Thành phần

Canh thang dinh dưỡng ^a	25,0 g
Thạch	2,75 g
Nước	1 000 ml

^a Đối với các thành phần, xem A.2 (không có thạch).

A.11.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng.

Chỉnh pH để sau khi khử trùng pH tương ứng là $7,2 \pm 0,2$ ở 25 °C, nếu cần.

Chuyển môi trường nuôi cấy với các lượng 5 ml vào các ống hoặc chai miệng rộng có nắp vặn có dung tích danh nghĩa khoảng 15 ml và chứa các ống Craigie (các ống hẹp ngắn, mở ở cả hai đầu). Ống Craigie cần cao hơn bề mặt thạch.

Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.2) được duy trì ở 115 °C trong 10 min.

Bảo quản ở nhiệt độ phòng đến 2 tháng.

A.12 Gelatin dinh dưỡng

A.12.1 Thành phần

Chất chiết từ thịt	3,0 g
--------------------	-------

Pepton ^a	5,0 g
Gelatin	120,0 g
Nước	1 000 ml

^a Ví dụ: phân giải casein bằng enzym.

A.12.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng.

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

Chuyển môi nuôi cấy trường với các lượng 5 ml vào các ống có dung tích danh nghĩa 15 ml.

Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.2) được duy trì ở 121 °C trong 15 min.

Để môi trường nguội theo vị trí thẳng đứng và bảo quản ở 5 °C (6.3) đến 2 tháng.

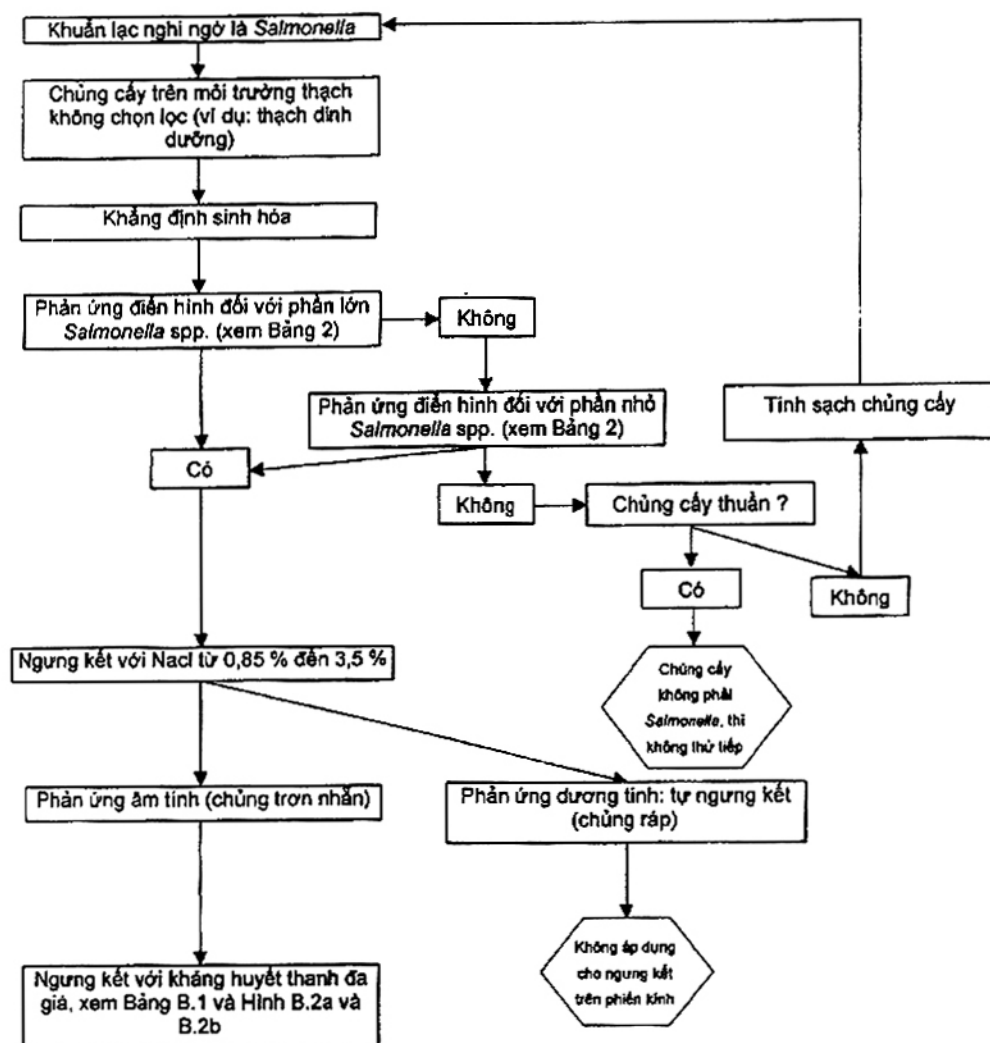
Phụ lục B

(Tham khảo)

**Ví dụ về các quy trình xác định typ huyết thanh
của chủng phân lập *Salmonella* chưa biết**

Trong Hình B.1 chỉ ra các bước cần thực hiện trước khi xác định typ huyết thanh các chủng phân lập *Salmonella*. Đưa ra các đề xuất về cách xử lý với các chủng tự ngưng kết (chủng thô), xem 9.2.3.

Các ví dụ về quy trình có thể được sử dụng để xác định typ huyết thanh chủng phân lập *Salmonella* chưa biết được tóm tắt trong Bảng B.1 và Hình B.2. Trong Bảng B.2 đưa ra thông tin về thành phần của các kháng huyết thanh đa giá (có thể khác nhau giữa các nhà cung cấp). Hình B.2 và Bảng B.2 thu được từ Tài liệu tham khảo [6].



Hình B.1 – Các bước cần thực hiện trước khi xác định typ huyết thanh *Salmonella* spp.

Bảng B.1. – Quy trình xác định typ huyết thanh chủng phân lập *Salmonella* chưa biết bằng cách ngưng kết với các kháng huyết thanh OMA và OMB đa giá

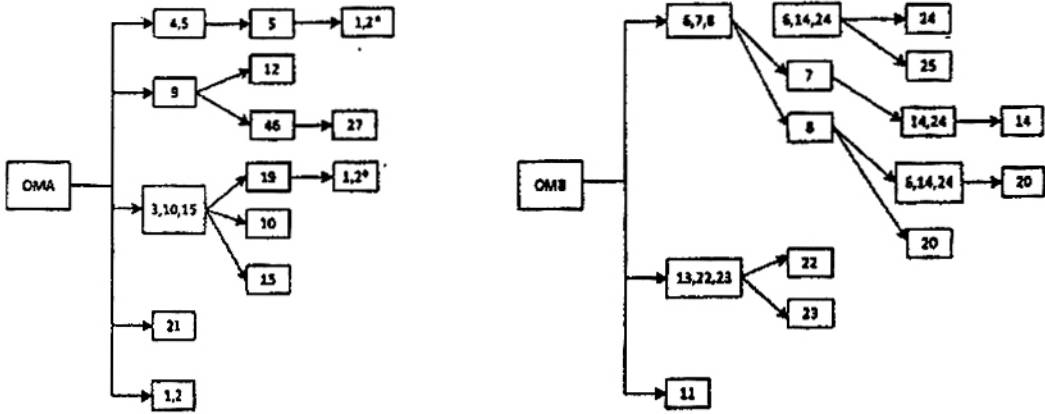
Bước 1 Phân tích kháng nguyên-O	Sử dụng các kháng huyết thanh đa giá	1.1 OMA Nếu dương tính: bước 2.1.1 Nếu âm tính: sang bước 1.2	1.2 OMB Nếu dương tính: bước 2.2.1 Nếu âm tính: xem chú thích a
Bước 2 Phân tích kháng nguyên-O	Sử dụng các nhóm kháng huyết thanh đặc hiệu – dùng cho một chủng phân lập đối với nhóm huyết thanh ^b	2.1.1 O:4,5 hoặc nhóm B Nếu dương tính: bước 3.1.1 Nếu âm tính: bước 2.1.2 2.1.2 O:9 hoặc nhóm D Nếu dương tính: bước 3.1.2 Nếu âm tính: bước 2.1.3 2.1.3 O:3,10,15 hoặc nhóm E Nếu dương tính: bước 3.1.3 Nếu âm tính: bước 2.1.4 2.1.4 O:21 hoặc nhóm L Nếu âm tính: bước 2.1.5 2.1.5 O:1,2 hoặc nhóm A	2.2.1 O:6,7,8 hoặc nhóm C Nếu dương tính: bước 3.2.1 Nếu âm tính: bước 2.2.2 2.2.2 O:13,22,23 hoặc O:13 Nếu dương tính: bước 3.2.2 Nếu âm tính: bước 2.2.3 2.2.3 O:11
Bước 3 Phân tích kháng nguyên-O	Sử dụng các kháng huyết thanh đơn giá – nhận biết serovar kháng nguyên-O đặc hiệu	3.1.1 Chủng phân lập nhóm B: O:5, O:27 3.1.2 Chủng phân lập nhóm D: O:46 đối với nhóm D ₂ O:27 đối với nhóm D ₃ 3.1.3 Chủng phân lập nhóm E: O:10, O:15, O:34 đối với nhóm E ₁ O:19 đối với nhóm E ₄	3.2.1 Chủng phân lập nhóm C O:7 đối với nhóm C ₁ O:8, O:6 ₁ , O:20 đối với nhóm C _{2,3} O:14, O:24, O:25 đối với nhóm H 3.2.2 Chủng phân lập nhóm G O:22, O:23
Bước 4 Phân tích kháng nguyên lỏng	Sử dụng các kháng huyết thanh đa giá ^c	H đa giá (pha 1 và pha 2) H đa giá (pha 2)	
	Sử dụng các kháng huyết thanh đơn giá	H:1(1,2) → (H:2, H:5, H:6, H:7) ^d H:a, H:b, H:c, H:d, H:E → (H:h, H:n, H:x, H:z ₁₅) ^d H:G(g,m) → (H:f, H:g, H:m; H:p, H:q H:s, H:t, H:u) ^d H:i, H:k, H:L → (H:v, H:w, H:l, z ₁₃ , H:l, z ₂₈) ^d H:y, H:z, H:Z ₄ → (H:z ₂₃ , H:z ₂₄ , H:z ₃₂) ^d H:z ₆ , H:z ₁₀ , H:z ₂₉ , H:z ₃₅ , v.v...	

^a Trong trường hợp phản ứng âm tính với cả hai kháng huyết thanh đa giá thì thử phân lập tiếp với kháng huyết thanh đa giá hoặc nhóm kháng huyết thanh đặc hiệu cho phép nhận biết lên đến nhóm O:67 hoặc gửi chủng phân lập đến phòng thử nghiệm chuẩn.

^b Nếu trong Bước 1 kháng huyết thanh đa giá của kháng thể khác với OMA và OMB được sử dụng thì kháng huyết thanh nhóm đặc hiệu trong bước 2 phải được sửa lại tương ứng.

^c Có thể bỏ qua việc sử dụng kháng huyết thanh đa giá kháng H và chọn kháng huyết thanh đơn giá tương ứng với bảng chủng phân lập serovar của nhóm huyết thanh được ước tính.

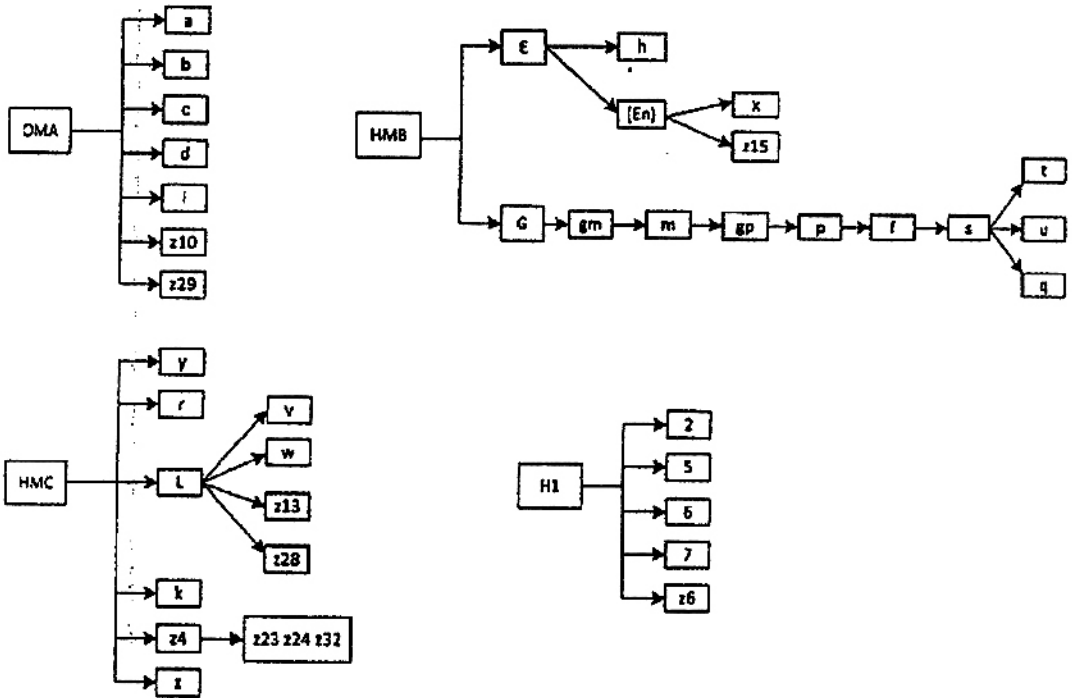
^d Kháng huyết thanh trong ngoặc đơn cần thiết để nhận biết các kháng nguyên của phức hợp kháng nguyên H tương ứng.



OMC	→	16	→	17	→	18	→	28	→	30	→	35	→	38
OMD	→	39	→	40	→	41	→	42	→	43	→	44	→	45
OME	→	47	→	48	→	50	→	51	→	52	→	53	→	61
OMF	→	54	→	55	→	56	→	57	→	58	→	59		
OMG	→	60	→	62	→	63	→	65	→	66	→	67		

* Có thể sử dụng huyết thanh O:1,2 để kiểm tra sự có mặt của kháng nguyên O:1

a) Các kháng nguyên thân – Các phép thử tuần tự có thể tiến hành với các kháng huyết thanh đơn giá và đa giá để phát hiện kháng nguyên *Salmonella* thân (Tài liệu tham khảo [6]) [Bước tiếp theo trong dãy hàng ngang được thực hiện khi các thử nghiệm trước đó cho thấy có phản ứng dương tính (ví dụ: nếu O:4,5 là dương tính, thì tiếp theo kiểm tra đối với O:5, v.v...). Thành phần của các kháng huyết thanh đa giá được sử dụng trong sơ đồ được đưa ra trong Bảng B.2.]



b) Kháng nguyên lông – Các phép thử tuần tự có thể tiến hành với các kháng huyết thanh đơn giá và đa giá để phát hiện các kháng nguyên *Salmonella* lông (Tài liệu tham khảo [6]) [Bước tiếp theo trong đường ngang được thực hiện khi các thử nghiệm trước đó cho thấy có phản ứng dương tính. Thành phần của các kháng nguyên đa giá được sử dụng trong sơ đồ này được nêu trong Bảng B.2.]

Hình B.2 – Phát hiện kháng nguyên

Bảng B.2 – Thành phần của các kháng huyết thanh đa giá liên quan đến Hình B.2 (Tài liệu tham khảo [6])

Yếu tố	Kháng huyết thanh đa giá	Kháng nguyên tương ứng
O	OMA	1,2,12 + 4,5,12 + 9,12 + 9,46 + 3,10 + 3,15 + 1,3,19 + 21
	OMB	6,7 + 6,8 + 11 + 13,22 + 13,23 + 6,14,24 + 8,20
H	H1	1,2 + 1,5 + 1,6 + 1,7 + z ₆
	HE	e,h + e,n,x + e,n,z ₁₅
	HG	f,g + g,p + g,m,s + g,m + m,t
	HMA	a + b + c + d + i + z ₁₀ + z ₂₉
	HMB	e,h + e,n,x + e,n,z ₁₅ + G
	HMC	k + y + L + z ₄ + r

Phụ lục C

(Tham khảo)

Phép thử sinh hóa

C.1 Phân biệt các phân loài *Salmonella*

C.1.1 Yêu cầu chung

Để phân biệt các phân loài *Salmonella*, cần thực hiện một số phép thử sinh hóa (xem bảng 2). Một số ví dụ về các phép thử được đưa ra trong C.1.2 đến C.1.5.

C.1.2 Phép thử malonat

Cấy vào canh thang malonat (xem A.4) dịch cấy thu được từ thạch nghiêng hoặc từ canh thang mới cấy (tốt nhất là cấy một vòng cấy 3 mm đầy canh khuẩn).

Ủ ấm canh thang đã cấy trong khoảng từ 34 °C đến 38 °C (6.1) và quan sát phản ứng sau 24 h ± 3 h và sau 48 h ± 3 h.

Trong trường hợp có phản ứng dương tính, màu sắc của môi trường thay đổi từ màu xanh lá cây sang màu xanh chàm (Prussian blue).

C.1.3 Phép thử dulcitol

Cấy vào canh thang dulcitol (xem A.5) với 1 ml canh khuẩn hoặc từ môi trường thạch nghiêng mới.

Ủ canh thang đã cấy trong khoảng từ 34 °C đến 38 °C (6.1) và quan sát các phản ứng sau 24 h ± 3 h và sau 48 h ± 3 h.

Trong trường hợp có phản ứng dương tính (axit hóa), thì môi trường sẽ chuyển sang màu hồng.

C.1.4 Phép thử ONPG

Nuôi cấy chủng phân lập cần thử nghiệm trên thạch dinh dưỡng nghiêng (hoặc môi trường khác) (xem A.2) có chứa 1,0 % khối lượng lactose. Nhũ hóa một vòng cấy đầy sinh khối vi khuẩn vào 0,25 ml dung dịch nước muối sinh lý để thu được huyền phù "đặc". Thêm 1 giọt toluen vào mỗi ống và lắc đều để giải phóng enzym.

Để các ống ở nhiệt độ trong khoảng từ 34 °C đến 38 °C (6.1) trong 5 min.

Thêm 0,25 mol dung dịch ONPG 0,013 3 mol/l (A.6) vào mỗi ống dung dịch huyền phù cần thử nghiệm. Ủ các ống trong khoảng từ 34 °C đến 38 °C (6.1) và kiểm tra các ống ở các khoảng thời gian đến 24 h. Màu vàng chứng tỏ kết quả dương tính.

C.1.5 Phép thử gelatinase

Cấy đậm sâu chất cấy thu được từ chủng cấy thuần được ủ "qua đêm" vào môi trường gelatin dinh dưỡng (xem A.12).

Ủ các ống trong khoảng từ 34 °C đến 38 °C (6.1) trong 24 h ± 3 h.

Đặt ống trong nước đá hoặc để trong tủ lạnh khoảng 30 min. Nếu gelatin bị phân giải, thì môi trường trong ống đông đặc sau khi làm lạnh, điều này cho thấy sự có mặt của gelatinase.

Ngoài ra, ống có thể được ủ ở 25 °C đến 1 tuần, kiểm tra hàng ngày về sự hóa lỏng của gelatin. Vì gelatin có thể hóa lỏng ở nhiệt độ 28 °C, nên cần làm mát các ống đã ủ để đảm bảo rằng việc hóa lỏng là do gelatinase và không phải do nhiệt độ ủ. Điều này có thể hữu ích cho việc sử dụng một ống không nuôi cấy làm kiểm chứng.

C.2 Phân biệt giữa *Salmonella* Paratyphi B và *Salmonella* Paratyphi B typ sinh học Java

Để phân biệt giữa *Salmonella* Paratyphi B và *Salmonella* Paratyphi B biovar Java, cần thực hiện phép thử phản ứng trên D-tartrat. Ngoài ra, có thể thực hiện phép thử PCR, như trong Tài liệu tham khảo [15].

Đối với phản ứng D-tartrat, có thể thực hiện quy trình sau đây (Tài liệu tham khảo [1]).

- Nuôi cấy chủng cần thử nghiệm trên môi trường thạch không chọn lọc.
- Hòa khuẩn lạc trong dung dịch nước muối 8,5 g/l đến mật độ khoảng 10^9 cfu/ml.
- Cấy các phần 50 µl của từng chủng vào hai ống chứa canh thang D-tartrat (xem A.6). Cũng cấy hai chủng kiểm chứng vào hai ống canh thang D-tartrat. Phép kiểm chứng: dương tính là *Salmonella* Paratyphi B typ sinh học Java, âm tính là *Salmonella* Paratyphi B.
- Ủ các ống hiếu khí (không lắ) trong khoảng từ 34 °C đến 38 °C (6.1) trong 18 h ± 2 h.
- Sau khi ủ, kiểm tra các ống về sự đổi màu. Nếu môi trường chuyển từ màu xanh sang màu vàng thì chứng tỏ phản ứng dương tính.
- Thêm vào một dãy các ống đựng canh thang mỗi ống 0,5 ml dung dịch chì axetat bão hòa (xem A.8) và để yên các ống tối thiểu 30 min để cho kết tủa lắng xuống.

TCVN 10780-3:2016

- Sau đó, kiểm tra các ống về kết tủa (thường sau 1 h đến 2 h). Trường hợp phản ứng dương tính thì có kết tủa lắng ở đáy ống và trường hợp phản ứng âm tính thì kết tủa vẫn còn lơ lửng trong môi trường canh thang. Các ống nghiệm này được so sánh với các ống kiểm chứng dương tính và âm tính. Nếu phép thử dương tính thì chủng được coi là *Salmonella* Paratyphi B typ sinh học Java và ống D-tartrat thứ hai được loại bỏ.
- Nếu phép thử âm tính thì ống thứ hai và các ống kiểm chứng được ủ thêm 6 ngày (tổng thời gian ủ là 7 ngày).
- Sau khi ủ xong, bổ sung chi axetat vào các ống như trên.
- Các chủng dương tính sau 7 ngày được coi là *Salmonella* Paratyphi B typ sinh học Java và chủng âm tính được coi là *Salmonella* Paratyphi B.

Phụ lục D

(tham khảo)

**Sơ đồ tổng thể về xác định typ huyết thanh của
năm serovar *Salmonella* có ảnh hưởng lớn đến sức khỏe cộng đồng**

0:4	0:9	0:7	0:7	0:8
↓	↓	↓	↓	↓
+	+	+	+	+
↓	↓	↓	↓	↓
(O:5→ + hoặc -)	H:G hoặc H:g	H:r	H:r	H:z ₁₀
	↓	↓	↓	↓
↓	+	+	+	+
H:i	↓	↓	↓	↓
↓	H:m	H:2	H:2	H:x
+	↓	↓	↓	↓
↓	+	+	-	+
H:2	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓
+	H:q, H:s	H:5	H:5	O:6 (O:6,1, O:6,7 hoặc O:6,14,24)
↓	↓	↓	↓	↓
	-	-	+	+
	↓			
	0:46			
	↓			
	-			
↓	↓	↓	↓	↓
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium	<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	<i>Salmonella</i> ser. Virchow	<i>Salmonella</i> ser. Infantis	<i>Salmonella</i> ser. Hadar

Phụ lục E

(Tham khảo)

Phương pháp đĩa chuẩn độ vi giếng để xác định typ huyết thanh *Salmonella* spp.

E.1 Yêu cầu chung

Quy trình nêu trong phụ lục này được dựa trên Tài liệu tham khảo [21].

Trong các phòng thử nghiệm việc xác định typ huyết thanh với số lượng lớn các chủng *Salmonella*, sử dụng kỹ thuật đĩa chuẩn độ vi giếng kết hợp với hệ thống phân phối kháng huyết thanh bán tự động vào các đĩa có thể có nhiều ưu điểm.

Tổng quan về các phương pháp:

- Các huyền phù vi khuẩn được chuẩn bị để phát hiện các kháng nguyên O (huyền phù-O) và các kháng nguyên-H (huyền phù H). Huyền phù vi khuẩn được chuẩn bị bằng cách nuôi cấy từng chủng cần thử nghiệm trong hai canh thang não-tim (xem A.9): một trong chai đối với huyền phù O và một trong ống nghiệm đối với huyền phù H. Cả hai canh thang được ủ ở nhiệt độ trong khoảng từ 34 °C đến 38 °C (6.1) trong 4 h đến 5 h.
- Sau khi ủ, các huyền phù O được hấp bằng hơi nước trong 30 min và sau đó pha loãng với một lượng tương đương dung dịch nước muối 8,5 g/l.
- Sau khi ủ, các huyền phù H bị diệt bằng cách thêm một lượng tương đương dung dịch nước muối formal 1 % (xem A.10) và để yên ở nhiệt độ phòng qua đêm trước khi thử nghiệm.
- Kháng huyết thanh được phân phối vào đĩa 96 giếng đáy tròn, sử dụng pipet đa kênh hoặc hệ thống phân phối tự động. Các đĩa đã chuẩn bị có thể được gắn kín và bảo quản ở 5 °C (6.3) tối đa 2 tuần.
- Các huyền phù O và H đã chuẩn bị được phân phối thủ công vào các đĩa vi giếng đã được chuẩn bị, sử dụng pipet bằng chất dẻo đúng một lần hoặc pipet có đầu tip dùng một lần.
- Các đĩa ngưng kết O được gắn kín và ủ ở 50 °C (6.9) trong 18 h ± 3 h.
- Các đĩa ngưng kết H được ủ trong 2 h trong nồi cách thủy ở 50 °C (6.9). Tốt nhất là sử dụng nồi cách thủy có giá đỡ không có lỗ nằm ngang bằng mức nước.
- Sau khi ủ, kiểm tra ngưng kết. Quan sát sự ngưng kết lắng dưới đáy giếng và tốt nhất là quan sát từ phía dưới đĩa, sử dụng gương.

Trước khi sử dụng, xác định độ chuẩn của các kháng huyết thanh cần thử nghiệm trong các đĩa vi giếng.

Các kháng huyết thanh dự định sử dụng trong phương pháp đĩa vi giếng là 23 kháng huyết thanh-O được sắp xếp trong hai đĩa vi giếng có kiểm soát dung dịch muối trong đĩa thứ hai. Đĩa đầu tiên chứa kháng huyết thanh-O đa giá (PSO), bảy kháng huyết thanh đối với các nhóm 4,5,12; 6,7; 6,8; 9,12; 3,10; 13,22; 6,14,24 và bốn kháng huyết thanh hấp thụ 1, 20, 27 và 46. Các đĩa thứ hai chứa các kháng huyết thanh hấp thụ 4, 5, 7, 8,9,10,14,15,19, 22 và 23.

E.2 Đĩa vi giếng 1 đối với các kháng nguyên O

Cột của đĩa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Huyết thanh trong từng giếng của cột	PSO	4,5,12	6,7	6,8	9,12	3,10	13,22	6,14,24	1	20	27	46

E.3 Đĩa vi giếng 2 đối với các kháng nguyên O

Cột của đĩa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Huyết thanh trong từng giếng của cột	4	5	7	8	9	10	14	15	19	22	23	Kiểm chứng

Mỗi chủng được thử nghiệm đối với tất cả các huyết thanh trong đĩa vi giếng. Tám chủng có thể được thử nghiệm trong mỗi bộ hai đĩa vi giếng.

Để xác định kháng nguyên-H, mỗi chủng được thử nghiệm với một bộ gồm 11 kháng huyết thanh và nước muối kiểm chứng. Các kháng huyết thanh được gọi ý là *Salmonella* H đa giá (PSH 1+2) có chứa kháng thể H = a cho đến H = z₂₉ để bao trùm pha 1 và kháng thể đối với pha 2 phức H = 1,2,5,6,7 (PSH 2). Bốn kháng huyết thanh đối với các phức H = E;G;L;1,2,5,6,7 và sáu kháng huyết thanh hấp thụ đối với H = b,d,i,r,z,z₁₀

E.4 Đĩa vi giếng đối với các kháng nguyên-H

Cột của đĩa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Huyết thanh trong từng giếng của cột	PSH 1+2	E	G	L	PSH2	b	d	i	r	z	z ₁₀	Kiểm chứng

TCVN 10780-3:2016

Việc nhận biết pha 1 là hoàn-chính đối với các chủng ngưng kết với PSH 1+2 và một trong sáu kháng huyết thanh hấp thụ và không cần tiếp tục thử đối với pha 1. Đối với các chủng ngưng kết với PSH và một trong bốn phức, thì cần thử nghiệm tiếp để nhận biết các kháng nguyên đơn giá. Các chủng chỉ ngưng kết với PSH được thử nghiệm với các kháng huyết thanh H = a, c, k, y, z₄, z₆ và z₂₉.

Sau khi đảo pha, cần lập lại quy trình thử kháng nguyên-H để xác định các kháng nguyên của pha khác.

Phụ lục F

(Tham khảo)

Ví dụ về các quy trình đảo pha

F.1 Phương pháp Sven Gard rút gọn

Phương pháp này được trích dẫn từ Tài liệu tham khảo [8], [13].

Chuẩn bị đĩa Petri đường kính 55 mm (6.7) với 10 ml thạch di động bề mặt đã đông đặc (A.3). Thêm 0,1 ml kháng *Salmonella* H từng giọt một và dàn đều trên bề mặt, sử dụng một thìa vô trùng (thủy tinh). Cấy chủng tại một điểm duy nhất ở giữa đĩa.

Ủ đĩa đã cấy ở 34 °C đến 38 °C (6.1) từ 18 h đến 21 h. Chủng di động trên bề mặt không bị ức chế pha H sử dụng để xác định lần thứ hai.

Phương pháp rút gọn này thường cho phép nhận biết pha thứ hai ở lần thử đầu tiên. Phương pháp này có ưu thế là các đĩa thạch được chuẩn bị trước và được bảo quản để sử dụng khi cần nhằm cải thiện sự biểu hiện của kháng nguyên-H hoặc để xác định pha.

F.2 Phương pháp ống Craigie

F.2.1 Yêu cầu chung

Ống Craigie được sử dụng để biểu lộ khả năng di động. Phương pháp này gồm có một ống hoặc lọ rộng miệng, có nắp vặn, có chứa thạch bán đặc (thạch từ 0,2 % đến 0,4 % phần khối lượng) ở giữa có ống hẹp, ngắn mở ở hai đầu, sao cho nó nhô ra trên mặt thạch (xem Hình F.1). Cần thận cấy đâm sâu chủng cần thử nghiệm vào trong từng ống. Sau khi ủ, lấy chủng cấy trên bề mặt thạch di động bên ngoài ống trung tâm tạo ra một quần thể tế bào di động (Tài liệu tham khảo [5]).

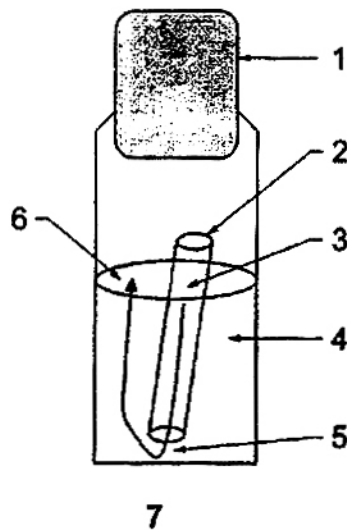
F.2.2 Chuẩn bị ống Craigie cho đảo pha

- Đặt ống môi trường Craigie (xem A.11) vào trong nồi hấp (hoặc các thiết bị thích hợp khác) trong 30 min để làm tan chảy thạch.
- Đặt ống Craigie với thạch đã tan chảy vào trong nồi cách thủy ở 47 °C đến 50 °C (6.8) để cho cân bằng nhiệt.
- Thêm 200 µl kháng huyết thanh cần thiết vào ống Craigie.

- Trộn đều bằng cách lắc nhẹ.
- Đặt ống Craigie ở 5 °C (6.3) để cho đặc lại.

F.2.3 Quy trình đảo pha sử dụng ống Craigie

- Cấy *Salmonella* vào ống Craigie bằng que cấy nhựa dùng một lần hoặc que cấy thẳng (chùm cấy được cấy vào trong ống bên trong).
- Ủ ống Craigie ở nhiệt độ trong khoảng từ 34 °C đến 38 °C (6.1).
- Kiểm tra sự phát triển vi khuẩn trong ống Craigie sau 24 h, 48 h và 72 h.
- Khi xuất hiện vi khuẩn trên bề mặt thạch (bên ngoài ống trung tâm), gạt phần vi khuẩn phát triển vào canh thang não-tim (xem A.9).
- Sau đó canh khuẩn được đem thử về kháng nguyên-H của nó.



CHÚ DẪN

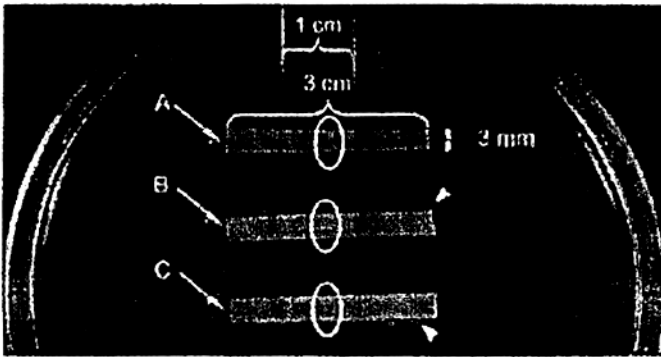
- | | |
|----------------------|--|
| 1 nắp | 5 đường đi của <i>Salmonella</i> sau đảo pha |
| 2 miệng ống | 6 bề mặt được cấy truyền |
| 3 đũa cấy | 7 ống Craigie |
| 4 môi trường bán đặc | |

Hình F.1 – Phương pháp ống Craigie

F.3 Phương pháp cầu-giấy

Quy trình nêu trong điều này được lấy từ Tài liệu tham khảo [4], là quy trình được sửa đổi từ quy trình ban đầu nêu trong Tài liệu tham khảo [23].

Xem Hình F.2. Lấy một dải thạch trypton đậu tương (rộng 1 cm) để tạo thành rãnh đi qua tâm của đĩa. Các dải giấy lọc (3 mm x 3 cm) được bố trí trên rãnh này. Kháng huyết thanh dựa theo pha nhận biết được chấm vào giữa cầu-giấy (được nhận biết bằng các vòng tròn màu trắng). Các chủng vi khuẩn được cấy vào phần cuối bên trái của các dải (được nhận biết bằng các vòng tròn màu trắng). Sau khi ủ, các pha biến thể, thể hiện một kháng nguyên lông khác, di chuyển về phía cuối bên phải của dải. Sau khi ủ 16 h, có thể nhìn thấy sự phát triển vi khuẩn xung quanh viền giấy lọc (thể hiện bằng các điểm tam giác màu trắng). Các chủng được cấy trong đĩa ở Hình F.2 là (A) *S. Choleraesuis* var. Kunzendorf (6,7:c :-); (B) *S. Typhimurium* (1,4,5,12:i:1,2); và (C) *S. Stanley* (4,5,12:d:1;2)



Hình F.2 – Phương pháp cầu-giấy đối với đào pha *Salmonella*

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ALFREDSSON G.A., BARKER R.M., OLD D.C., DUGUID J.p. Use of tartaric acid isomers and citric acid in the biotyping of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg. (Lond.)*. 1972, **70** pp. 651-666
- [2] US Food and Drug officials. 2001. Bacteriological Analytical Manual. BAMR53:ONPGtest. Available (viewed 2013-06-04) at: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm062262.htm>
- [3] BRENNER F.W., VILLAR R.G., ANGULO F.J., TAUXE R., SWAMINATHAN B. *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 2000, **38** pp. 2465-2467
- [4] CHIOU C.S., HUANG J.F., TSAI L.H., Hsu K.M., LIAO C.S., CHANG H.L. A simple and low-cost paper-bridged method for *Salmonella* phase reversal. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2006, **54** pp. 315-317
- [5] Craigie J. STUDIES ON THE SEROLOGICAL REACTIONS OF FLAGELLA OF *B. TYPHOSUS*. *J. IMMUN.* 1931, **21** p. 417
- [6] DANAN C., FREMY S., MOURY F., BOHNERT M., BRISABOIS A. 2009. Determining the serotype of isolated *Salmonella* strains in the veterinary sector using the rapid slide agglutination test. Cahiers de la Référence, N°2, CR2-09M01, December 2009. Available (viewed 2013-06-04) at: <http://www.afssa.fr/euroreference/numero2/index.htm>
- [7] EWING W.H. *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*. New York: Elsevier, Fourth edition, 1986
- [8] GARD S. Das Schwarmphanomen in der *Salmonella*-Gruppe und seine praktische Ausnützung. [The swarming phenomenon in the *Salmonella* group and its practical use], *z. Hyg. Infektionskr.* 1938, **120** pp. 615-619.
- [9] GRIMONT P.A.D., & WEILL F.-X. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th edition.¹⁾ WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris: Institut Pasteur. Available (viewed 2013-06-04) at: <http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>.
- [10] GUIBOURDENCHE M., ROGGENTIN R, MIKOLEIT M., FIELDS P.I., BOCKEMÜHL J., GRIMONT P.A.D. et al. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* 2010, **161** pp. 26-29
- [11] HENDRIKSEN R.S., MIKOLEIT M., CARLSON V.P., KARLSMOSE S., VIEIRA A.R., [ENSEN A.B. et al. WHO Global Salm-Surv External Quality Assurance System for Xác định typ huyết thanh of

¹⁾ Supplements to the White-Kauffmann-Le Minor scheme are published in *Res. Microbiol.*, a publication of the Institut Pasteur (formerly *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*), e.g. Reference [10].

Salmonella Isolates from 2000 to 2007. *J. Clin. Microbiol.* 2009, 47 pp. 2729-2736

- [12] KAUFFMANN F. On the principles of classification and nomenclature of *Enterobacteriaceae*. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.* 1959, 9 pp. 1-6
- [13] KOEHN A. Technical modification of the swarming plate method according to Sven Gard in *Salmonella* diagnosis. *Zentralbl. Bakteriol.* 1970, 215 pp. 449-455
- [14] LEIFSON E. Fermentation of natri malonate as a means of differentiating *Aerobacter* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1933, 26 pp. 329-330
- [15] MALORNY B., BUNGE C., HELMUTH R. Discrimination of D-tartrate-fermenting and non-fermenting *Salmonella entérica* subsp. *entérica* isolates by genotypic and phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41 pp. 4292-4297
- [16] POPOFF M.Y. *Guidelines for the preparation of Salmonella antisera*. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris:Institut Pasteur, 2001
- [17] POPOFF M.Y., & LE MINOR L.E. Genus XXXIII. *Salmonella* Lignieres 1900, 389. In BRENNER D.J., KRIEG N.R., STALEY J.T. editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edition, Vol. 2, *The Proteobacteria, Part B The Gammaproteobacteria*. New York, NY:Springer, 2005, pp. 764-799
- [18] POPOFF M.Y., BOCKEMUHL J., BRENNER F.W. Supplement 1998 (No. 42) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* 2000, 154 pp. 63-65
- [19] POPOFF M.Y., BOCKEMUHL J., GHEESLING L.L. Supplement 2001 (No. 45) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* 2003, 151 pp. 173-174
- [20] American Society for Microbiology. Publications Board meeting minutes. *Salmonella* nomenclature. *ASM News*. 1999, 65 p. 769
- [21] SHIPP C.R., & ROWE B. A mechanized microtechnique for *Salmonella* serotyping. *J. Clin. Pathol.* 1980, 33 pp. 595-597
- [22] TINDALL B.J., GRIMONT P.A.D., GARRITY G.M., EUZEBY J.P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int.J.Syst.Evol. Microbiol.* 2005, 55 pp. 521-524
- [23] WANG T.K., TSENG T.C., LEE J.H., WANG W.T., TSAI J.L., Ho S.I., PAN T.M. Analysis of *Salmonella* serovars in Taiwan by the phase induction method] [Article in Chinese]. *Zhanghua Min Guo Wei Shang Wu Ji Mian YiXue Za Zhi* [Chin. J. Microbiol. Immunol.]. 1994, 27, pp. 13-24