

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 9717:2013**

**ISO 19250:2010**

Xuất bản lần 1

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC – PHÁT HIỆN *SAMONELLA* SPP.**

*Water quality - Detection of Samonella spp.*

**HÀ NỘI – 2013**

**Lời nói đầu**

**TCVN 9717:2013** hoàn toàn tương đương với ISO 19250:2010

**TCVN 9717:2013** do Ban kỹ thuật Tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC 147 *Chất lượng nước* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố

**Lời giới thiệu**

*Samonella* là vi khuẩn phân bố rộng rãi trên toàn thế giới, *Samonella* thường được phân loại như là tác nhân gây bệnh, mặc dù độc tính và tác nhân gây bệnh của *Samonella* có tính biến đổi rộng. Vật chủ tự nhiên của *Salmonella* gồm con người, vật nuôi, gia súc, gia cầm và động vật hoang dã kể cả loài chim. Con người và động vật có thể bài tiết vi khuẩn này khi mang bệnh hoặc có triệu chứng mang bệnh. Do đó không thể loại bỏ *Salmonella* khỏi môi trường. Khi nhiễm vào người, *Salmonella* có thể gây bệnh nguy hiểm.

Vi môi trường nước được công nhận là môi trường truyền nhiễm, cần phải kiểm soát sự có hoặc không có *Salmonella* trong môi trường nước nơi mà quan sát thấy nguy cơ của sự truyền nhiễm. *Salmonella* có thể có trong tất cả các loại nước thải nông nghiệp và nước thải sinh hoạt, nước sạch, kể cả nước uống và nước ngầm, cũng như nước biển.

Phát hiện *Salmonella* trong nước thường yêu cầu nồng độ theo bậc. Vì các tế bào *Salmonella* có thể xuất hiện với số lượng thấp và bị tổn thương trong môi trường nước, nên phát hiện *Salmonella* trong môi trường nước thường yêu cầu bước tăng sinh sơ bộ.

## Chất lượng nước – Phát hiện *Salmonella* spp.

*Water quality – Detection of Salmonella spp.*

**CẢNH BÁO** – Để đảm bảo an toàn và sức khỏe cho nhân viên trong phòng thí nghiệm, điều cần thiết là các phép thử để phát hiện *Salmonella* và đặc biệt *S. enterica* Subsp. *Typhi* (*Salmonella* ser. *Typhi*) và *S. enterica* subsp. *enterica* ser. *Paratyphi* (*Salmonella* ser. *Paratyphi*), chỉ thực hiện trong các phòng thí nghiệm được trang bị thích hợp, dưới sự kiểm soát của nhà vi sinh vật có kinh nghiệm và cần đặc biệt cẩn trọng trong việc loại bỏ tất cả các vật liệu sử dụng cho nuôi cấy.

Người sử dụng tiêu chuẩn này cần phải thành thạo với các thực hành trong phòng thí nghiệm thông thường. Tiêu chuẩn này không đề cập tới mọi vấn đề an toàn liên quan đến người sử dụng. Trách nhiệm của người sử dụng là phải xác lập độ an toàn, bảo đảm sức khỏe phù hợp với các quy định của quốc gia.

**QUAN TRỌNG** – Điều chủ yếu là phép thử theo tiêu chuẩn này cần được tiến hành bởi những nhân viên được đào tạo phù hợp.

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện *Salmonella* spp. (giả định hoặc khẳng định) trong các mẫu nước. Đối với cho mục đích dịch tễ hoặc quá trình điều tra sự bùng phát, có thể phương tiện khác cũng được yêu cầu.

**CẢNH BÁO** – Có thể phương pháp này không bao gồm tất cả loài *Salmonella* ser. *Typhi* và ser *Paratyphi*.

**CHÚ THÍCH:** Đối với phương pháp tiếp cận bán định lượng, phép thử MPN có thể được thực hiện sử dụng các thể tích mẫu thích hợp. Trong những trường hợp này, điều chỉnh thể tích của đệm nước pepton tương ứng.



## TCVN 9717:2013

### 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là 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 4829 (ISO 6579), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện Salmonella spp. trên đĩa thạch.*

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 6507-1 (ISO 6887-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, 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.*

TCVN 8880 (ISO 19458), *Chất lượng nước – Lấy mẫu để phân tích vi sinh vật.*

TCVN 9716 (ISO 8199), *Chất lượng nước – Hướng dẫn chung về đếm vi sinh vật bằng nuôi cấy.*

ISO 7704, *Water quality – Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses (Chất lượng nước – Đánh giá màng lọc sử dụng để phân tích vi sinh vật).*

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng các thuật ngữ sau:

#### 3.1

**Salmonella spp. giả định** (presumptive *Salmonella* spp.)

Vi khuẩn phát triển trong môi trường tăng sinh chọn lọc được quy định, và tạo các khuẩn lạc điển hình hoặc không điển hình trên môi trường chọn lọc đặc.

#### 3.2

**Salmonella spp. khẳng định** (confirmed *Salmonella* spp.)

Vi khuẩn phát triển trong môi trường tăng sinh chọn lọc được quy định, tạo các khuẩn lạc điển hình hoặc không điển hình trên môi trường chọn lọc đặc, và hiển thị những đặc tính về sinh hóa và huyết thanh đặc trưng.

**CHÚ THÍCH:** Các đặc tính huyết thanh và sinh hóa đặc trưng được xác định bằng các phép thử quy định trong tiêu chuẩn này.

#### 3.3

**Phát hiện *Salmonella*** (*Salmonella* detection)

Phép xác định sự có hay không có *Salmonella* (3.4).

### 3.4

#### **Salmonella spp.**

#### **Salmonella**

Những vi sinh vật mà tạo nên các khuẩn lạc dạng điển hình hoặc không điển hình trên môi trường chọn lọc đặc và hiển thị các đặc tính huyết thanh và sinh hóa đặc trưng.

## 4 Nguyên tắc

### 4.1 Khái quát

Phát hiện *Salmonella* cần có bốn bước liên tiếp (xem Phụ lục A).

Thông thường, cần phải tiến hành bước tăng sinh sơ bộ để phát hiện *Salmonella* có số lượng ít hoặc *Salmonella* bị tổn thương. Một số *Salmonella* và những loại *Salmonella* bị tổn thương có thể yêu cầu thời gian ủ thêm (4.3). Hơn nữa, *Salmonella* có thể xuất hiện với một số lượng nhỏ và thường kèm theo số lượng lớn hơn đáng kể của đại diện khác trong các họ vi khuẩn đường ruột hoặc họ khác. Do đó, tăng sinh có chọn lọc là cần thiết.

### 4.2 Tăng sinh sơ bộ trong môi trường lỏng không chọn lọc

Cấy đệm nước pepton (B.1) vào thể tích mẫu đã biết hoặc pha loãng, ở nhiệt độ môi trường xung quanh, sau đó ủ ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  trong  $(18 \pm 2)$  h. Các thể tích mẫu lớn hơn có thể được làm giàu sử dụng phương pháp lọc màng và màng lọc sau khi thêm đệm nước pepton.

CHÚ THÍCH: Đối với nước thải, các thời gian ủ ngắn hơn hoặc cấy mẫu trực tiếp vào môi trường chọn lọc (4.3) cho các kết quả tốt hơn.

Đối với phương pháp tiếp cận bán định lượng, phép thử MPN có thể được thực hiện sử dụng các thể tích mẫu thích hợp. Trong những trường hợp này, điều chỉnh thể tích của đệm nước pepton tương ứng.

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

Cấy dịch thu được ở 4.2 vào canh Rappaort-Vassiliadis với đậu tương (canh RVS) và canh Muller-Kauffmann tetrathionat-novobiocin (MKTTn).

Cấy canh RVS vào ở  $(41,5 \pm 1)^\circ\text{C}$  trong  $(24 \pm 3)$  h và canh MKTTn ở  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  trong  $(24 \pm 3)$  h.

Để phát hiện *Salmonella* spp. phát triển chậm, ủ canh tăng sinh thêm  $(24 \pm 3)$  h tới tổng số  $(48 \pm 4)$  h ở  $(41,5 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ .

CHÚ THÍCH: *Salmonella Typhi* và *Salmonella Paratyphi A* thường không quan trọng trong quan trắc chất lượng nước định kỳ, nhưng có thể có liên quan với các nghiên cứu dịch tễ. Canh MKTTn được sử dụng để tăng sinh bằng cách ủ ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  trong  $(24 \pm 3)$  h và thu hồi hầu hết các chủng của *Salmonella*, kể cả một số chủng *Salmonella Paratyphi*, nhưng không vì vậy mà có thể thu hồi chủng *Salmonella Paratyphi C*. Không sử dụng canh MKTTn nếu *Salmonella Typhi* bị nghi ngờ sau khi sử dụng canh selenit systin.

## TCVN 9717:2013

### 4.4 Đổ đĩa và nhận dạng

Cấy dịch tăng sinh thu được ở 4.3 vào hai môi trường đặc chọn lọc:

- a) Thạch xylo lysin deoxycholat (thạch XLD);
- b) Mọi môi trường chọn lọc đặc bất kỳ khác bổ sung vào thạch XLD và, nếu có thể áp dụng, thích hợp để phân lập các chủng *Salmonella*, *Salmonella Typhi* và *Salmonella Paratyphi* dương tính với lactoza – phòng thử nghiệm có thể chọn môi trường đó để sử dụng.

Ủ thạch XLD ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  và kiểm tra sau  $(24 \pm 3)$  h để kiểm tra sự xuất hiện của khuẩn lạc, các khuẩn lạc này được xem như *Salmonella* giả định. Ủ thạch chọn lọc thứ hai theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

CHÚ THÍCH: Để tham khảo, thạch Brilliant xanh (BGA), thạch sunfit bismuth, v.v..., có thể được sử dụng làm môi trường đổ đĩa thứ hai.

### 4.5 Khẳng định

Các khuẩn lạc *Salmonella* giả định được cấy truyền rồi đổ đĩa như mô tả trong 4.4 và khẳng định để nhận dạng chúng bằng phép thử sinh hóa (8.5.3) và thử huyết thanh (8.5.4) thích hợp.

## 5 Thiết bị, dụng cụ

Thiết bị phòng thí nghiệm vi sinh vật thông thường (xem TCVN 6404 (ISO 7218)) và, cụ thể, các thiết bị sau:

5.1 **Yêu cầu chung**, ngoài dụng cụ thủy tinh có sẵn đã được khử khuẩn, dụng cụ thủy tinh khử khuẩn như quy định ở TCVN 9716 (ISO 8199). Dụng cụ có sẵn có thể được thay thế bằng dụng cụ thủy tinh sử dụng lại nếu có yêu cầu kỹ thuật thích hợp.

5.2 **Nồi hấp**, có khả năng duy trì ở  $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$  và ở  $(115 \pm 3)^\circ\text{C}$ .

5.3 **Bể điều nhiệt hoặc tủ ấm**, có khả năng duy trì ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ .

5.4 **Bể điều nhiệt hoặc tủ ấm**, có khả năng duy trì ở  $(41,5 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ .

5.5 **Bể điều nhiệt**, có khả năng vận hành ở  $(70 \pm 1)^\circ\text{C}$  và ở  $50^\circ\text{C}$  đến  $55^\circ\text{C}$ .

5.6 **Thiết bị lọc màng**, như đã quy định trong TCVN 9716 (ISO 8199).

5.7 **Màng lọc khử khuẩn**, có cỡ lỗ danh nghĩa là  $0,45\ \mu\text{m}$ .

Chất lượng màng lọc có thể khác nhau tùy theo thương hiệu hoặc lô. Do đó, nên kiểm tra chất lượng định kỳ, như đã quy định trong ISO 7704.

5.8 **Máy đo pH**, có độ chính xác hiệu chuẩn  $\text{pH} \pm 0,1$  ở  $20^\circ\text{C}$  đến  $25^\circ\text{C}$ .

5.9 **Kẹp vô khuẩn**.

**5.10 Que cấy vòng vô khuẩn**, đường kính khoảng 3 mm (dung tích 10  $\mu$ L), và có kim hoặc dây cấy.

## **6 Lấy mẫu**

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Mẫu được lấy theo TCVN 8880 (ISO 19458).

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

## **7 Thuốc thử và môi trường nuôi cấy**

CHÚ THÍCH: Hướng dẫn về đảm bảo chất lượng và thử tính năng, xem TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-1)<sup>[2]</sup> và TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-2)<sup>[3]</sup>.

**7.1 Vật liệu cơ bản**, để các kết quả đồng nhất, trong quá trình chuẩn bị môi trường, sử dụng môi trường đã loại nước hoàn toàn hoặc sử dụng các thành phần có chất lượng đồng nhất và các thuốc thử đạt cấp phân tích đã được công nhận.

Có thể sử dụng các loại thuốc thử khác miễn là có thể cho kết quả tương đương.

**7.2 Nước**, TCVN 4851 (ISO 3696)<sup>[1]</sup>, loại 3.

**7.3 Môi trường nuôi cấy**, đã được chuẩn bị theo Phụ lục B.

**7.3.1 Đệm nước pepton**, đệm nước pepton môi trường tăng sinh sơ bộ không chọn lọc (BPW, B.1).

**7.3.2 Canh rappaport-Vassiliadis với đậu tương** (canh RVS, B.2), môi trường tăng sinh chọn lọc.

**7.3.3 Thạch xyclo lysin deoxycholat** (thạch XLD, B.3).

**7.3.4 Môi trường đồ đĩa chọn lọc đặc thứ hai**, việc chọn môi trường thích hợp thứ hai là quyền lựa chọn của phòng thử nghiệm. Phải tuân thủ chính xác hướng dẫn của nhà sản xuất về việc chuẩn bị môi trường để sử dụng.

**7.3.5 Thạch dinh dưỡng** (B.4), hoặc thạch không chọn lọc thích hợp khác.

**7.3.6 Thạch TSI** (thạch triple sugar và iron, B.5).

Có thể sử dụng thạch DSI để thay thế.

**7.3.7 Thạch urê**, Christensen (B.6).

**7.3.8 Môi trường L-Lyzin khử cacboxyl** (B.7).

**7.3.9 Canh selenit cystin** (B.8).

**7.3.10 Canh Muller-Kaufmann tetrathionat-novobiocin** (MKTTn, B.9).

**7.3.11 Chất trợ lọc** (B.10).

## **TCVN 9717:2013**

### **8 Cách tiến hành**

Xem Hình A.1.

#### **8.1 Chuẩn bị mẫu**

Để chuẩn bị mẫu, lọc và cấy môi trường phân lập, theo hướng dẫn như đã quy định trong TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) và TCVN 9716 (ISO 8199). Tốt nhất là bắt đầu kiểm tra ngay sau khi lấy mẫu. Nếu lưu giữ mẫu ở nhiệt độ xung quanh, trong vòng 12 h sau khi lấy mẫu thì bắt đầu kiểm tra. Trong các trường hợp ngoại lệ, cho phép mẫu được lưu giữ ở  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  trong 24 h trước khi kiểm tra.

Thể tích mẫu phân tích phụ thuộc vào loại nước. Các thể tích thường dùng cho nước sinh hoạt và nước uống là 1 000 mL tới 5 000 mL. Đối với nước mặt bị ô nhiễm và nước thải, thường dùng thể tích phân tích nhỏ hơn.

Nếu mẫu cần pha loãng (ví dụ mẫu nước thải), chuẩn bị mẫu pha loãng này như được quy định trong TCVN 9716 (ISO 8199).

#### **8.2 Tăng sinh sơ bộ không chọn lọc**

##### **8.2.1 Tăng sinh sơ bộ không chọn lọc với thể tích nhỏ hơn 10 mL**

Cấy 50 mL BPW (B.1) vào mẫu hoặc mẫu pha loãng ở nhiệt độ phòng và ủ ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  trong  $(18 \pm 2)$  h.

##### **8.2.2 Tăng sinh không chọn lọc với thể tích lớn hơn 10 mL**

Lọc một thể tích nước thích hợp để kiểm tra nước.

Nhúng màng lọc vào 50 mL BPW (B.1).

Có thể thay thế bằng cách thêm mẫu vào thể tích BPW nồng độ gấp đôi.

Chú ý quy trình cuối là không thích hợp cho nước khoáng có hàm lượng muối cao hoặc nước biển.

Ủ đĩa nuôi cấy ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  trong  $(18 \pm 2)$  h.

##### **8.2.3 Khuyến nghị đối với nước đục và nước bị ô nhiễm**

Đối với nước đục hoặc nước bị ô nhiễm, có thể bổ sung chất trợ lọc vô khuẩn (B.10) và lọc mẫu qua tấm thấm hút vô khuẩn đóng vai trò như một lớp đệm hỗ trợ thay cho sử dụng màng lọc.

Trong trường hợp này, lấy một lượng nhỏ chất trợ lọc, thường là 15 mL, tạo thành một lớp đầu tiên trên tấm thấm hút. Trộn một lượng nhỏ 15 mL thứ hai với thể tích mẫu và chất trợ lọc. Đối với nước đục hoặc nước bẩn, những lượng nhỏ bổ sung có thể được lọc. Khi quá trình lọc hoàn tất, gỡ bỏ phễu và cẩn thận chuyển tấm thấm hút và chất trợ lọc vào BPW (B.1). Nếu cần, giữ lại một thể tích nhỏ trong BPW để tráng phễu sao cho thể tích cuối cùng của BPW là 100 mL. Ủ để xác định sự có hoặc không có *Salmonella*, hoặc pha chế như dãy MPN cho phép đếm bán định lượng.

### 8.3 Tăng sinh chọn lọc

Để môi trường tăng sinh cân bằng với nhiệt độ phòng nếu chúng được bảo quản ở nhiệt độ thấp hơn. Chuyển 0,1 mL chất cấy thu được ở 8.2 vào ống nghiệm chứa 10 mL canh RVS (B.2). Khi sử dụng MKTTn (B.9), chuyển 1 mL chất cấy thu được ở 8.2 vào ống nghiệm chứa 10 mL canh MKTTn.

Ủ canh RVS đã cấy ở  $(41,5 \pm 1,0)$  °C trong  $(24 \pm 3)$  h và, nếu cần (xem 4.3), trong  $(48 \pm 4)$  h. Chú ý tiến hành sao cho nhiệt độ ủ tối đa không quá  $(42,5)$  °C. Ủ canh MKTTn đã cấy ở  $(36 \pm 2)$  °C trong  $(24 \pm 3)$  h.

CHÚ THÍCH: Đối với canh RVS nồng độ magie clorua và nhiệt độ ủ đã được tối ưu hóa để thu được độ thu hồi tốt mà không bị mất tính chọn lọc theo Tài liệu tham khảo [5].

### 8.4 Đổ đĩa

#### 8.4.1 Khái quát

Để các đĩa thạch XLD và môi trường đổ đĩa chọn lọc thứ hai (xem TCVN 4829 (ISO 6579), 5.2.4.2) đạt tới cân bằng ở nhiệt độ phòng nếu chúng được bảo quản ở nhiệt độ thấp hơn. Nếu cần, làm khô bề mặt của đĩa trước khi sử dụng.

#### 8.4.2 Đổ đĩa từ canh RVS

Sau khi ủ khoảng  $(24 \pm 3)$  h, sử dụng dịch cấy thu được trong canh RVS, dùng que cấy vòng vô khuẩn (5.10) cấy lên bề mặt môi trường tăng sinh sau đây để thu được khuẩn lạc phân lập tốt:

- a) Thạch XLD (B.3);
- b) Môi trường chọn lọc bổ sung (7.3.4).

Đối với thạch XLD, lật ngược đĩa để mặt đáy hướng lên trên, và đặt chúng trong tủ ấm (5.3) để ở  $(36 \pm 2)$  °C trong  $(24 \pm 3)$  h. Đối với môi trường đổ đĩa thứ hai, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

#### 8.4.3 Đổ đĩa từ canh MKTTn

Sau khi ủ ở  $(36 \pm 2)$  °C trong  $(24 \pm 3)$  h sử dụng đĩa nuôi cấy thu được, lặp lại quy trình đã quy định trong 8.4.2 với hai môi trường đổ đĩa chọn lọc.

### 8.5 Khẳng định

#### 8.5.1 Khái quát

Nếu có thể, sử dụng bộ thử nhận dạng có bán sẵn ngoài thị trường để kiểm tra sinh hóa *Salmonella*. Sử dụng các bộ thử nhận dạng này theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

#### 8.5.2 Chọn lọc các khuẩn lạc để khẳng định

Đối với mục đích quan trắc thường xuyên, để khẳng định, lấy từ mỗi đĩa Petri của từng môi trường chọn lọc (8.4), ít nhất một khuẩn lạc riêng rẽ được xem là *Salmonella* điển hình hoặc giả định. Nếu khuẩn lạc đầu tiên không được khẳng định là *Salmonella*, thì sau đó lấy thêm bốn khuẩn lạc nữa.

## TCVN 9717:2013

Trên thạch XLD, các khuẩn lạc *Salmonella* đặc thù thường có tâm đen và vùng xung quanh trong suốt hơi nhuộm đỏ do sự thay đổi màu của chất chỉ thị. Nên lấy ít nhất năm khuẩn lạc để nhận dạng trong trường hợp nghiên cứu dịch tễ học. Nếu trên một đĩa có ít hơn năm khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc nghi ngờ, thì lấy tất cả các khuẩn lạc điển hình hoặc nghi ngờ đó để khẳng định.

CHÚ THÍCH: Việc nhận dạng các khuẩn lạc *Salmonella* cần có bề dày kinh nghiệm và hình dạng bên ngoài của chúng có thể thay đổi ít nhiều không chỉ từ huyết thanh này đến huyết thanh khác mà còn từ mẻ này đến mẻ khác của môi trường cấy chọn lọc được sử dụng. *Shigella*, *Providencia* và *Salmonella* spp. âm tính với H<sub>2</sub>S (ví dụ *Salmonella Paratyphi A*) xuất hiện màu hồng với tâm hồng đậm; *Salmonella* có lactose dương tính phát triển trên môi trường XLD xuất hiện màu vàng có tâm đen hoặc không có tâm đen; *Enterobacteriaceae* ví dụ *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus*, và *Serratia* xuất hiện màu vàng, khuẩn lạc đục.

Cấy ria các khuẩn lạc đã chọn lọc trên bề mặt của các đĩa thạch "không chọn lọc" đã làm khô sơ bộ (ví dụ thạch dinh dưỡng, B.4) sao cho các khuẩn lạc phân lập tốt phát triển được.

Ủ các đĩa đã cấy ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  trong  $(24 \pm 3)$  h.

Nếu môi trường đổ đĩa không tạo ra các khuẩn lạc riêng biệt, thì lặp lại theo cách mà đảm bảo tạo ra các khuẩn lạc đơn lẻ riêng rẽ. Sử dụng các khuẩn lạc đã phân lập đơn lẻ để phân tích hóa sinh và, nếu thích hợp, khẳng định huyết thanh bằng phép thử huyết thanh. Nếu sử dụng bộ thử sinh hóa để nhận dạng, thì theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### 8.5.3 Khẳng định sinh hóa

#### 8.5.3.1 Khái quát

Dùng que cấy vòng, cấy môi trường được quy định từ 8.5.3.2 đến 8.5.3.4 vào từng mẻ nuôi cấy thu được từ các khuẩn lạc đã chọn lọc trong 8.5.2.

#### 8.5.3.2 Thạch TSI

Cấy ria đường vạch trên thạch TSI (B.5) làm nghiêng bề mặt thạch và đâm thủng phần thạch dày hơn. Ủ ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  trong  $(24 \pm 2)$  h. Diễn giải về bề ngoài của môi trường thạch này như trong Bảng 1.

Bảng 1 – Diễn giải sự thay đổi trong môi trường

Dạng thể hiện	Giải thích
<b>Phần dày hơn</b>	
Màu vàng (axit)	Gluco dương tính (sự lên men của glucoza)
Màu đỏ hoặc không đổi màu (kiềm)	Gluco âm tính (không lên men cacbohydrat)
Màu đen	Sinh sunfua hydro
Bọt hoặc vết rạn	Sinh khí từ glucoza
<b>Phần bề mặt nghiêng</b>	
Màu vàng	Dương tính lactoza hoặc sucroza (sử dụng lactoza hoặc sucroza)
Màu đỏ hoặc không đổi màu	Âm tính lactoza và sucroza (không sử dụng lacto và sucro)

Các khuẩn lạc *Salmonella* điển hình thể hiện tính kiềm (màu đỏ) trên mặt nghiêng của thạch, tính axit (màu vàng) phần dày hơn của ống thạch và sinh khí (bọt khí) và (khoảng 90 % các trường hợp) sinh sunfua hydro (thạch bị đen).

Khi *Salmonella* dương tính với lactoza được phân lập, thì mặt nghiêng của ống thạch TSI có màu vàng. Do vậy, việc khẳng định sơ bộ các chủng *Salmonella* không chỉ dựa trên các kết quả của phép thử trên thạch TSI.

#### 8.5.3.3 Thạch urê

Cấy ria trên bề mặt nghiêng của thạch urê (B.6). Ủ ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  trong 24 h và kiểm tra thường xuyên. Nếu phản ứng là dương tính, thì sự thủy phân urê giải phóng ra amoniac, làm phenol màu đỏ chuyển thành màu hồng và sau đó chuyển thành màu đỏ hồng. Phản ứng thường xuất hiện sau 2 h đến 4 h. Khuẩn lạc *Salmonella* điển hình cho phản ứng âm tính, tức là không có sự tạo màu.

#### 8.5.3.4 Môi trường L-lysin khử caboxyl

Cấy ngay dưới bề mặt của môi trường L-lysin khử caboxyl lỏng (B.7). Ủ ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  trong  $(24 \pm 3)$  h. Khuẩn lạc *Salmonella* điển hình cho màu tím sau khi ủ.

#### 8.5.3.5 Diễn giải phép thử sinh hóa

Nói chung, *Salmonella* cho các phản ứng được nêu trong Bảng 2.

**Bảng 2 – Các phản ứng sinh hóa của *Salmonella***

Phép thử <sup>a</sup>	Mục	Phản ứng	Chủng <i>Salmonella</i> cho phản ứng % <sup>b</sup>
TSI glucoza (tạo thành axit)	8.5.3.2	+	100,0
TSI glucoza (tạo thành khí)	8.5.3.2	+	91,9 <sup>c</sup>
TSI lactoza	8.5.3.2	-	99,2 <sup>d</sup>
TSI sucroza	8.5.3.2	-	99,5
TSI hydro sunfua	8.5.3.2	+	91,6 <sup>e</sup>
Thủy phân urê	8.5.3.3	-	99,0
L-lysin khử carboxyl	8.5.3.4	+	94,6 <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Xem Tài liệu tham khảo [8].

<sup>b</sup> Các số liệu này chỉ ra rằng không phải tất cả các chủng của *Salmonella* đều cho các phản ứng đánh dấu + hoặc - rõ rệt. Các số liệu này có thể khác nhau về khu vực địa lý và nguồn nước.

<sup>c</sup> *Salmonella* Typhi là loài yếm khí.

<sup>d</sup> Loài phụ arizonae *Salmonella enterica* cho phản ứng lactoza dương tính hoặc âm tính nhưng luôn dương tính với  $\beta$ -galactosidase. Loài phụ diarizonae *Salmonella enterica* cho phản ứng lactoza âm tính, nhưng cho phản ứng  $\beta$ -galactosidase dương tính. Hơn nữa, có thể các chủng này không tạo ra H<sub>2</sub>S. Để nghiên cứu các chủng này, có thể tiến hành thử sinh hóa bổ sung (Tài liệu tham khảo [9][10]).

<sup>e</sup> Đôi khi, sự tạo thành axit gây khó khăn cho việc nhận dạng do tạo thành màu đen đậm.

<sup>f</sup> *Salmonella Paratyphi A* là âm tính.

Các phản ứng sinh hóa trong Bảng 3 là điển hình của *Salmonella* spp.



**Bảng 3 – Phản ứng sinh hóa điển hình của *Salmonella* spp tới phép thử**

Phép thử	Mục	Phản ứng
TSI lactoza	8.5.3.2	-
TSI glucoza	8.5.3.2	+
TSI sucroza	8.5.3.2	-
TSI hydro sunfua	8.5.3.2	+
Thủy phân urê	8.5.3.3	-
L-lysin khử cacboxyl	8.5.3.4	+

Phân lập chỉ khác nhau từ các thông số điển hình đã liệt kê trong Bảng 3 bằng một hoặc hai phản ứng có thể vẫn là *Salmonella* và có thể sẽ được khảo sát tiếp và gửi tới phòng thử nghiệm chuẩn đã được công nhận để khẳng định.

#### 8.5.4 Khẳng định huyết thanh và kiểu huyết thanh

Phân lập *Salmonella* điển hình theo các phản ứng sinh hóa đã liệt kê trong Bảng 3 là *Salmonella* spp. giả định và cần được khảo sát tiếp bằng phòng thử nghiệm chuẩn, nếu cần. Sự có mặt của *Salmonella* và kháng nguyên H, O-, Vi-, được phát hiện bằng sự ngưng kết trên mặt nghiêng như đã quy định trong TCVN 4829 (ISO 6579) với huyết thanh thích hợp, từ các khuẩn lạc nguyên chất (8.5.2) và sau đó loại bỏ các chủng tự ngưng kết.

Phân lập *Salmonella* cho phản ứng huyết thanh dương tính được khẳng định là *Salmonella* spp.

## 9 Biểu thị kết quả

Theo các kết quả của phép thử sinh hóa (8.5.3) và khẳng định huyết thanh (8.5.4), chỉ thị *Salmonella* là giả định hay khẳng định được phát hiện trong phần phép thử được kiểm tra.

## 10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất thông tin sau:

- Phương pháp thử sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- Tất cả thông tin được yêu cầu để nhận dạng đầy đủ mẫu;
- Kết quả, được biểu thị là *Salmonella* khẳng định hay giả định được phát hiện hoặc không được phát hiện trong phần mẫu thử  $V$  mL nước.
- Nếu thực hiện quan trắc dịch tễ học, đặc tính kỹ thuật của số khuẩn lạc được phân lập từ môi trường đặc chọn lọc (8.5.2) và các loại hoặc kiểu huyết thanh được quan sát (8.5.4);
- Đối với phép thử MPN, ước lượng số *Salmonella* trên mỗi thể tích mẫu.

**11 Đảm bảo chất lượng**

Phòng thí nghiệm phải có hệ thống kiểm soát chất lượng xác định rõ ràng để đảm bảo rằng các thiết bị dụng cụ, thuốc thử, và kỹ thuật là phù hợp với phép thử. Sử dụng đối chứng dương, đối chứng âm, và mẫu trắng là một phần của phép thử.

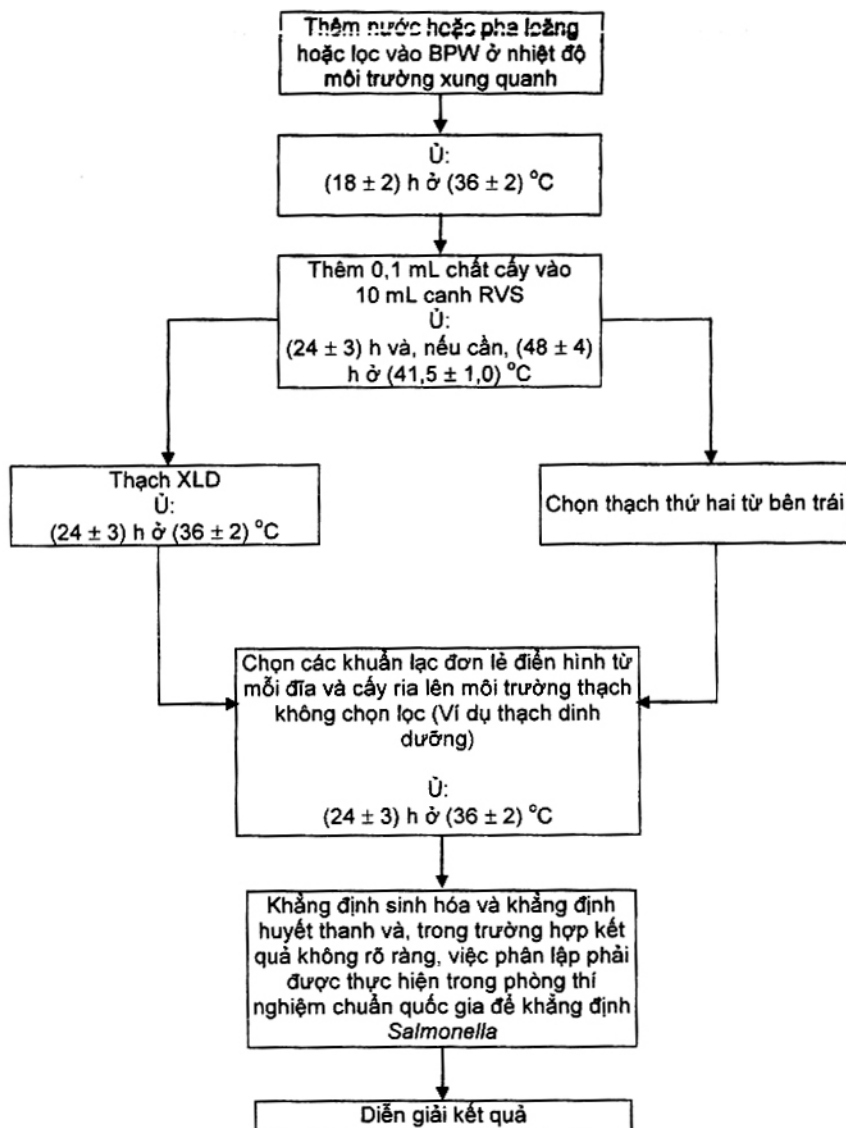
Thực hiện đối chứng dương bằng cách đưa mẫu đối chứng vào bình kiểm soát của môi trường tăng sinh (xem B.1). Tiếp tục với bình kiểm soát như đối với nuôi cấy thử nghiệm.

Chủng đối chứng được chọn phải dễ nhận dạng và không phải là chủng được phân lập thường xuyên bằng phép thử trong phòng thí nghiệm. Nên tham khảo phòng thí nghiệm chuẩn quốc gia thích hợp.

## Phụ lục A

(Quy định)

## Sơ đồ quy trình thử



Hình A.1

**Phụ lục B**

(Quy định)

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

Như một cách chuẩn bị thay thế đã quy định trong phụ lục này, có thể sử dụng chất pha loãng hoặc môi trường đã loại nước hoàn toàn. Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Để chuẩn bị môi trường, sử dụng nước (7.2) không chứa chất ảnh hưởng đến phát triển của các loài vi sinh vật dưới các điều kiện thử.

**B.1 Môi trường đậm nước pepton (BPW)**

	Nồng độ	Nồng độ gấp đôi
Men tiêu hóa của casein	10,0 g	20,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g	10,0 g
Dinatri hydrophosphat ngậm mười hai phân tử nước ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) <sup>a</sup>	9,0 g	18,0 g
Kali dihydrophosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,5 g	3,0 g
Nước (7.2)	1 000 mL	1 000 mL

<sup>a</sup> Nếu sử dụng dinatri hydrophosphat khan ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), thì phải thêm 3,5 g đối với BPW nồng độ và 7,0 g BPW nồng độ gấp đôi.

Hòa tan các thành phần trong nước, nếu cần, đun nóng (mà không đun sôi).

Điều chỉnh pH, nếu cần, sao cho sau khi khử khuẩn pH là  $7,0 \pm 0,2$  ở  $25^\circ\text{C}$ .

Phân chia môi trường vào các bình có dung tích thích hợp để thu được các phần cần cho thử nghiệm.

Khử khuẩn 15 min trong nồi hấp (5.2) đặt ở  $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ .

Bảo quản khoảng 3 tháng ở  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ .

**B.2 Canh rappaport-vassiliadis với đậu tương (RVs)****B.2.1 Môi trường cơ bản, Dung dịch A**

Men tiêu hóa của đậu tương	5,0 g
Natri clorua (NaCl)	8,0 g
Kali dihydrophosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,4 g
Dikali hydrophosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0,2 g
Nước (7.2)	1 000 mL

Hòa tan các thành phần trong nước, nếu cần, đun nóng tới khoảng  $70^\circ\text{C}$ .

Chuẩn bị dung dịch này trong cùng ngày chuẩn bị môi trường RVs.

**TCVN 9717:2013**

**B.2.2 Dung dịch B**

Magie clorua ngậm sáu phân tử nước ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )	400 g
Nước (7.2)	1 000 mL

Hòa tan magie clorua trong nước.

Ngược lại với sự chuẩn bị các dung dịch thuốc thử thường dùng, nhưng theo công thức nguyên bản của Tài liệu tham khảo [5][6], thêm các chất vào thể tích nước đã định để có dung dịch với tổng thể tích là 1,26 L.

Vì muối này hút ẩm rất mạnh, nên cần hòa tan hết lượng  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  trong bình chứa mới mở. Ví dụ, thêm 250 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  vào 625 mL nước, cho thể tích tổng số là 788 mL và nồng độ khối lượng khoảng 31,7 g trên 100 mL  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ .

Dung dịch này bền trong khoảng 2 năm, nếu được bảo quản trong chai thủy tinh tối màu đậy kín ở nhiệt độ phòng.

**B.2.3 Dung dịch C**

Oxalat xanh malachit	0,4 g
Nước (7.2)	100 mL

Hòa tan oxalat xanh malachit trong nước.

Dung dịch bền trong 8 tháng nếu được bảo quản trong chai thủy tinh tối màu ở nhiệt độ phòng.

**B.2.4 Môi trường hoàn chỉnh**

Dung dịch A (B.2.1)	1 000 mL
Dung dịch B (B.2.2)	100 mL
Dung dịch C (B.2.3)	10 mL

Cho 100 mL dung dịch B và 10 mL dung dịch C (thể tích tổng số là 1 110 mL) vào 1 000 mL môi trường cơ bản (dung dịch A).

Điều chỉnh pH, nếu cần, sao cho sau khi khử khuẩn pH là  $5,2 \pm 0,2$  ở  $25^\circ C$ .

Phân chia vào các ống nghiệm với định lượng 10 mL hoặc vào bình với định lượng 100 mL.

Khử khuẩn 15 min trong nồi hấp (5.2) ở  $(115 \pm 3)^\circ C$ .

Bảo quản môi trường khoảng 7 ngày ở  $(5 \pm 3)^\circ C$ . Môi trường bền khoảng 4 tháng nếu bảo quản trong chai hoặc ống có nút vặn ở  $(5 \pm 3)^\circ C$ .

**CHÚ THÍCH:** Thành phần môi trường cuối cùng (thể tích tổng là 1 110 mL) là: 4,5 g/L enzym phân hủy của đậu tương; 7,2 g/L natri clorua ( $NaCl$ ); 1,44 g/L kali dihydrophosphat ( $KH_2PO_4$ ) + dikali hydrophosphat ( $K_2HPO_4$ ); 28,6 g/L magie clorua ngậm sáu phân tử nước ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ); 0,036 g/L oxalat xanh malachit.

Khối lượng của 28,6 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  tương ứng với 13,4 g  $MgCl_2$  (khan).

**B.3 Thạch lysin xyloza deoxycholát (thạch XLD)**

D(+)-Xyloza	3,75 g
L(+)-Lysin hydroclorua	5,0 g
Natri deoxycholát	1,0 g
Cao nấm men	3,0 g
Sucroza	7,5 g
Lactoza	7,5 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Natri thiosunfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )	6,8 g
Sắt (III) amoni citrat	0,8 g
Phenol đỏ	0,08 g
Thạch	9 g đến 18 g
Nước (7.2)	1 000 mL
<sup>a</sup> Phụ thuộc vào tính đồng của thạch	

Hòa tan các thành phần vào trong nước và vừa đun vừa khuấy liên tục. Không đun quá nóng hoặc sôi.

Làm mát ngay trong bể điều nhiệt tới 45 °C đến 50 °C. Đun quá mức hoặc làm mát kéo dài có thể tạo ra kết tủa.

Điều chỉnh pH, nếu cần, sao cho pH là  $7,4 \pm 0,2$  ở 25 °C.

Rót môi trường vào trong đĩa Petri và bảo quản môi trường đã làm mát trong túi nhựa được làm kín tới 2 tuần ở  $(5 \pm 3)$  °C. Nếu cần, làm khô đĩa trước khi sử dụng.

**B.4 Thạch dinh dưỡng**

Cao thịt	3,0 g
Men tiêu hóa pepton	5,0 g
Thạch	9 g đến 18 g <sup>a</sup>
Nước (7.2)	1 000 mL
<sup>a</sup> Phụ thuộc vào tính đồng của thạch	

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

Điều chỉnh pH, nếu cần, sao cho sau khi khử khuẩn pH là  $7,0 \pm 0,2$  ở 25 °C.

Chuyển môi trường nuôi cấy vào trong ống hoặc chai có dung tích thích hợp.

Khử khuẩn 15 min trong nồi hấp (5.2) ở  $(121 \pm 3)$  °C.

Chuyển khoảng 15 mL môi trường tan chảy vào đĩa Petri vô khuẩn.

Bảo quản các đĩa đã rót khoảng 2 tháng ở  $(5 \pm 3)$  °C. Làm khô để bảo vệ các đĩa.

Có thể sử dụng môi trường thạch không chọn lọc thích hợp khác để thay thế.

## TCVN 9717:2013

### B.5 Thạch triple sugar và iron (thạch TSI)

Cao thịt	3,0 g
Cao nấm men	3,0 g
Men tiêu hóa pepton	20,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Lactoza	10,0 g
Sucroza	10,0 g
Glucoza	1,0 g
Sắt (III) citrat	0,3 g
Natri thiosunfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )	0,3 g
Phenol đỏ	0,024 g
Thạch	9 g đến 18 g
Nước (7.2)	1 000 mL

\* Phụ thuộc vào tính đồng của thạch

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

Điều chỉnh pH, nếu cần, sao cho sau khi khử khuẩn pH là  $7,4 \pm 0,2$  ở  $25^\circ\text{C}$ .

Phân chia môi trường với định lượng 10 mL vào trong các ống nghiệm, tốt nhất là có nút vặn.

Khử khuẩn 15 min trong nồi hấp (5.2) ở  $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ . Đặt ở vị trí nghiêng để bề dày thạch trên đáy từ 25 mm đến 50 mm.

Bảo quản các ống nghiệm khoảng 1 tháng ở  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ .

### B.6 Thạch urê (Christensen)

#### B.6.1 Môi trường cơ bản

Men tiêu hóa pepton	1,0 g
Glucoza	1,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Kali dihydrophosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2,0 g
Phenol đỏ	0,012 g
Thạch	9 g đến 18 g
Nước (7.2)	1 000 mL

\* Phụ thuộc vào tính đồng của thạch

Hòa tan các thành phần hoặc môi trường cơ bản hoàn chỉnh khô trong nước, nếu cần, đun nóng.

Điều chỉnh pH, nếu cần, sao cho sau khi khử khuẩn pH là  $6,8 \pm 0,2$  ở  $25^\circ\text{C}$ .

Khử khuẩn 15 min trong nồi hấp (5.2) ở  $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ . Sau khi hấp, làm mát trong bồn nước tới khoảng  $50^\circ\text{C}$ .

Bảo quản 1 tháng ở  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ .

**B.6.2 Dung dịch urê**

Urê	400 g
Nước (7.2) vừa đủ	1 000 mL

Hòa tan urê trong nước và lọc để khử khuẩn. Bảo quản khoảng 1 tháng ở  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ .

**B.6.3 Môi trường hoàn chỉnh**

Môi trường cơ bản (B.6.1)	950 mL
Dung dịch urê (B.6.2)	50 mL

Ở điều kiện vô khuẩn, cho dung dịch urê vào môi trường cơ bản, làm tan chảy trước và sau đó để nguội đến nhiệt độ  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

Điều chỉnh pH, nếu cần, sao cho pH là  $6,8 \pm 0,2$  ở  $25 ^\circ\text{C}$ .

Phân chia môi trường hoàn chỉnh vào trong ống nghiệm vô khuẩn với định lượng 10 mL.

Đặt nghiêng ống nghiệm.

Bảo quản ống nghiệm khoảng 7 ngày ở  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ .

**B.7 Môi trường L-Lyzin đã khử nhóm cacboxyl**

L-Lyzin monohydroclorua	5,0 g
Cao nấm men	3,0 g
Glucoza	1,0 g
Bromocresol đỏ tía	0,015 g
Nước (7.2)	1 000 mL

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

Điều chỉnh pH, nếu cần, sao cho sau khi khử khuẩn pH là  $6,8 \pm 0,2$  ở  $25 ^\circ\text{C}$ .

Phân chia môi trường với định lượng 2 mL đến 5 mL vào trong, ống cấy hẹp vô khuẩn, tốt nhất là có nắp vặn.

Khử khuẩn 15 min trong nồi hấp (5.2) ở  $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ . Bảo quản trong ống nghiệm khoảng 3 tháng ở  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ .

**B.8 Canh selenit cystine**

Trypton	5,0 g
Lactoza	4,0 g
Dinatri hydrophosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	10,0 g
L-Cystin	0,01 g
Natri biselenit ( $\text{NaHSeO}_3$ )	4,0 g
Nước (7.2)	1 000 mL

Hòa tan 4 g natri biselenit trong 1 000 mL nước và sau đó thêm thành phần duy trì.



## TCVN 9717:2013

Làm nóng để hòa tan và phân chia vào trong bình chứa với chiều cao tối đa ít nhất là 60 mm.

Khử khuẩn bằng cách đặt trong buồng hơi nước chảy tự do trong 15 min.

### CẢNH BÁO – Không hấp.

Bảo quản môi trường đã chuẩn bị ở  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$  tránh ánh sáng.

**CHÚ Ý** – Tài liệu tham khảo [7] báo cáo sảy thai và có thể ảnh hưởng gây quái thai lên người có thai làm việc trong phòng thí nghiệm do có thể nuốt phải natri biselenit. Để giảm thiểu rủi ro ảnh hưởng gây quái thai tới người làm việc trong phòng thí nghiệm, không thêm natri biselenit dạng bột khô nhưng nên chuẩn bị riêng rẽ như dạng dung dịch để duy trì thành phần được thêm.

## B.9 Canh muller-kauffmann tetrathionat-novobiocin (MKTTn)

### B.9.1 Môi trường cơ bản

Men tiêu hóa cao thịt	4,3 g
Men tiêu hóa casein	8,6 g
Natri clorua (NaCl)	2,6 g
Canxi cacbonat ( $\text{CaCO}_3$ )	38,7 g
Natri thiosunfat ngậm năm phân tử nước ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	47,8 g
Mật bò để vi khuẩn sử dụng	4,78 g
Brilliant xanh	9,6 g
Nước (7.2)	1 000 mL

Hòa tan thành phần cơ bản đã sấy khô hoặc môi trường hoàn chỉnh đã sấy khô vào trong nước bằng cách đun sôi trong 5 min.

Điều chỉnh pH, nếu cần, sao cho pH là  $8,2 \pm 0,2$  ở  $25 ^\circ\text{C}$ .

Trộn kỹ môi trường vô khuẩn và phân chia vào trong các ống nghiệm vô khuẩn có dung tích 10 mL.

Môi trường cơ bản có thể được bảo quản khoảng 4 tuần ở  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ .

### B.9.2 Dung dịch iot và iodua

Iot ( $\text{I}_2$ )	20,0 g
Kali iodua (KI)	25,0 g
Nước (7.2)	100 mL

Hòa tan hoàn toàn kali iodua trong 10 mL nước, sau đó thêm iot và pha loãng tới 100 mL bằng nước. Không đun nóng.

Bảo quản dung dịch đã chuẩn bị trong tối ở nhiệt độ xung quanh trong bình chứa được đóng kín.

**B.9.3 Dung dịch novobiocin**

Muối natri novobiocin	0,04 g
Nước (7.2)	5 mL

Hòa tan muối natri novobiocin trong nước và lọc để khử khuẩn.

Bảo quản tới khoảng 4 tuần ở  $(3 \pm 2)^\circ\text{C}$ .

**B.9.4 Môi trường hoàn chỉnh**

Môi trường cơ bản (B.9.1)	1 000 mL
Dung dịch iot-iodua (B.9.2)	20 mL
Dung dịch novobiocin (B.9.3)	5 mL

Cho 5 mL dung dịch novobiocin vô khuẩn vào 1 000 mL môi trường cơ bản. Trộn, sau đó thêm 20 mL dung dịch iot và iodua. Trộn kỹ.

Phân chia môi trường vô khuẩn theo định lượng 10 mL vào trong bình chứa vô khuẩn.

Sử dụng môi trường hoàn chỉnh trong ngày chuẩn bị.

**B.10 Chất trợ lọc**

Điatomit	1 g
Nước (7.2)	15 mL

Cân lượng thích hợp điatomit vào chai phù hợp và thêm nước.

Khử khuẩn 15 min trong nồi hấp (5.2) ở  $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ .

Bảo quản trong tối ở nhiệt độ phòng và sử dụng trong 12 tháng.

**Phụ lục C**  
(Tham khảo)

**Kết quả thử liên phòng thử nghiệm**

**C.1 Giới thiệu**

Phép thử liên phòng thử nghiệm quốc tế được tổ chức với 26 phòng thí nghiệm từ bảy nước tham gia nghiên cứu. Đĩa Lenticule chứa tổ hợp *Salmonella* Gold Coast và các sinh vật nền khác nhau (*Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter* spp. và *Acinetobacter baumannii*) phòng thí nghiệm kiểm soát chất lượng nước của các tổ chức bảo vệ sức khỏe, Newcastle-upon-Tyne, UK chuẩn bị (xem Bảng C.1), cùng đối chứng âm (mẫu trắng), được gửi tới các phòng thí nghiệm thành viên và được thử ở hai mức nồng độ khác nhau.

Các phòng thí nghiệm được gửi hai bộ của năm đĩa Lenticule khác nhau đã mã hóa từ A đến E và được đề nghị thử một trong mỗi bộ ở các ngày riêng biệt để thu được số liệu có độ tái lập trong các phòng thí nghiệm. Các đĩa Lenticule được hòa tan trong 1 000 mL nước và năm mẫu thử 100 mL sau đó được đánh giá cho sự có mặt của *Salmonella*. Các mẫu thử có *Salmonella* được phát hiện sau đó được pha loãng thêm (1→5) và kiểm tra mỗi phần thử.

Phương pháp quy định sử dụng hai môi trường chọn lọc khác nhau với kể cả XLD và một môi trường phù hợp khác. Các thành viên tham gia được yêu cầu ghi lại chi tiết về môi trường, nhà sản xuất, mẻ và ngày hết hạn của môi trường sử dụng.

Các kết quả được ghi là "phát hiện được" hoặc "không phát hiện được" và các bảng số liệu đầy đủ được gửi trở lại phòng thí nghiệm tổ chức.

**C.2 Phân bố của tế bào trong mẫu và mẫu phụ**

Các đĩa Lenticule<sup>1)</sup> được thiết kế để chứa khoảng 100 đơn vị khuẩn lạc (cfu) khi được hoàn nguyên trong 1 000 mL nước cho ra khoảng 10 cfu trên 100 mL như mẫu thử. Khi được pha loãng (1→5), thì cho khoảng 2 cfu trên 100 mL. Nếu tế bào trong mẫu tuân theo phân phối Poisson, thì có khả năng rằng trong 100 mL mẫu không chứa bất cứ một tế bào nào là rất nhỏ ( $1/220\ 26$ ) và xác suất mẫu chứa ít nhất một tế bào là rất cao ( $p = 0,999\ 95$ ). Xác suất này của một kết quả dương tính, trong mỗi mẫu của năm mẫu lặp lại, giá trị kết quả dương tính trung bình sẽ là 4,999 77 với độ lệch chuẩn,  $s$ , là 0,015 066. Tỷ lệ phát hiện 100 % sẽ cho ra năm kết quả không nằm trong năm kết quả dương tính của mỗi phòng thí nghiệm.

Trong trường hợp các mẫu phụ được pha loãng, xác suất mà mẫu chứa ít nhất một tế bào vi khuẩn là khoảng 86 % ( $p = 0,864\ 66$ ). Mỗi mẫu của 10 phép thử lặp lại thành công với xác suất này. Nếu nghi

<sup>1)</sup> Sản phẩm có bán sẵn. Thông tin này được nêu ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không bắt buộc bởi sản phẩm quy định trong tiêu chuẩn.

ngờ số dương tính đúng theo sự phân phối nhị thức có thông số  $n=10$  và  $p=0,865$ , thì số dương tính trung bình qua 10 phép thử sẽ là 8,646 65 với  $s=1,081\ 76$ . Tuy nhiên, phép thử ngẫu nhiên của đĩa Lenticule<sup>1)</sup> được chỉ thị phép đếm tế bào đúng giữa 130 cfu/đĩa đến 200 cfu/đĩa. Do đó, giá trị Poisson coi như ở giữa 10 cfu/100 mL đến 20 cfu/100 mL trong mẫu không được pha loãng, và 2 cfu/100 mL và 4 cfu/100 mL cho các mẫu phụ đã pha loãng khi phân tích số liệu sử dụng hồi quy logictic [SAS 8.2<sup>1)</sup>].

Các kết quả được ghi là “được phát hiện” hoặc “không được phát hiện” và các dãy số liệu đầy đủ được quay trở lại phòng thí nghiệm.

Bảng C.1 – Thành phần mẫu

Mẫu [Bộ đĩa Lenticule]	Sinh vật	Mục tiêu cfu/đĩa
A	<i>E. coli</i>	100
	<i>K. aerogenes</i>	1 000
	<i>E. faecalis</i>	1 000
	<i>Citrobacter</i> spp.	1 000
B	<i>Salmonella Gold Coast</i>	10
C	<i>Salmonella Gold Coast</i>	10
	<i>E. coli</i>	100
	<i>K. aerogenes</i>	1 000
	<i>E. faecalis</i>	1 000
D	Mẫu trắng	
E	<i>Salmonella Gold Coast</i>	10
	<i>E. coli</i>	100
	<i>K. aerogenes</i>	1 000
	<i>E. faecalis</i>	1 000
	<i>A. baumannii</i>	1 000

### C.2.1 Kết quả

Các kết quả nhận được từ 26 phòng thí nghiệm tham gia và kết quả được tóm tắt trong Bảng C.2 và C.3.

Bảng C.2 – Tổng các kết quả đối với mẫu không pha loãng

Thông số	Mẫu trắng	Chỉ có sinh vật nền	Chỉ có <i>Salmonella Gold Coast</i>	<i>Salmonella Gold Coast</i> và sinh vật nền
Số phòng thí nghiệm gửi kết quả	26	26	26	26
Tổng số kết quả	245	252	246	611
Số kết quả loại trừ	5	0	0	15
Số kết quả chấp nhận	240	252	246	596

**Bảng C.3 – Tổng các kết quả đối với mẫu pha loãng**

Thông số	Chỉ có <i>Salmonella</i> Gold Coast	<i>Salmonella</i> Gold Coast và sinh vật nền
Số phòng thí nghiệm gửi kết quả	26	26
Tổng số kết quả	485	935
Số kết quả loại trừ	0	30
Số kết quả chấp nhận	485	905

Hồi quy logistic [SAS 8.2] cho thấy không có chênh lệch đáng kể giữa mẫu chứa *Salmonella* ( $p=0,98$ ) hoặc giữa các ngày ( $p=0,83$ ) đối với mẫu pha loãng. Có rất ít biến động trong kết quả từ mẫu không pha loãng ( $p=0,98$ ) và không có sự khác nhau giữa mẫu thử B, C và E hoặc giữa A và D. Do vậy, số liệu được tổng hợp toàn bộ các phòng thí nghiệm, mẫu thử, và ngày thử. Tất cả các số liệu gửi về từ một phòng thí nghiệm (phòng thí nghiệm 14) đã được loại trừ, khi có bằng chứng rõ ràng của các vấn đề kỹ thuật trong phòng thí nghiệm này. Các phân tích thống kê cũng loại trừ các số liệu trong trường hợp dán nhãn sai hoặc lỗi ghi chép. Xem Bảng C.4.

**Bảng C.4 – Tổng kết các kết quả đối với mẫu và mẫu pha loãng với số lượng và phần trăm dương tính**

Mẫu	Sinh vật	Số dương tính/số kết quả	Dương tính %
A1	<i>E. coli</i> , <i>K. aerogenes</i>	0/130	0
A2	<i>E. faecalis</i> , <i>Citrobacter</i> spp.	0/130	0
B1	<i>Salmonella</i> Gold Coast	130/130	100
B1 đã pha loãng 1→5		236/250	94,4
B2		126/126	100
B2 đã pha loãng 1→5		252/255	98,9
C1	<i>Salmonella</i> Gold Coast, <i>E. coli</i>	129/130	99,2
C1 đã pha loãng 1→5		243/250	97,2
C2	<i>K. aerogenes</i> , <i>E. faecalis</i>	126/126	100
C2 đã pha loãng 1→5		236/240	98,3
D1	Mẫu trắng	0/130	0
D2		0/125	0
E1P	<i>Salmonella</i> Gold Coast, <i>E. coli</i>	128/130	98,5
E1P đã pha loãng 1→5		236/240	98,3
E2P	<i>K. aerogenes</i> , <i>E. faecalis</i>	120/121	99,2
E2P đã pha loãng 1→5		239/245	97,6
	<i>A. baumannii</i>		

Phương pháp quy định sử dụng hai môi trường đặc chọn lọc với bao gồm cả thạch XLD và môi trường phù hợp khác, do phòng thí nghiệm quyết định. Môi trường thứ cấp khác nhau được sử dụng được tóm tắt trong Bảng C.5.

**Bảng C.5 – Môi trường thứ cấp**

Môi trường	Số phòng thí nghiệm
Thạch Brilliant xanh (BGA)	8
Đĩa <i>Salmonella</i> AES (ASAP)	2
Thạch rambach	10
Thạch sucrose lacto phenol đỏ brilliant xanh (BPLS)	2
Phát hiện <i>Salmonella</i> và môi trường nhận dạng (SMID)	2
Môi trường Õnöz	2

### C.2.2 Mẫu không pha loãng A1 đến E1

Mỗi một đĩa Lenticule, thực hiện phép thử lặp lại 130. Số lượng tổng số của các kết quả chắc chắn là 763 trong 759 là dương tính (Bảng C.3). Số lượng được chấp nhận là 762,965 có độ lệch chuẩn là 0,186. Điều này gợi ý rằng hoặc tốc độ phát hiện là thấp hơn 100 % hoặc phân phối nhị thức bị quá phân tán. Khi xuất hiện số lượng tế bào > 10 trên đĩa (disc), sự quá phân tán gần như có khả năng giải thích kết quả, và không được chấp nhận trong xem xét vi sinh vật.

### C.2.3 Mẫu pha loãng (B1P, C1P, và E1P) pha loãng tất cả ở 1→5

1 480 phép thử chắc chắn đã thực hiện, 1 442 là dương tính. Giả thiết đếm trung bình 2 cfu và tốc độ phát hiện 100 %, số lượng dương tính được chấp nhận là 1 279,6 ( $s=5,52$ ). Khoảng thời gian dung sai 99 % từ 1 254 đến 1 304 kết quả dương tính. Các kết quả chỉ ra số lượng trung bình của cfu trên mẫu phụ > 2. Số lượng kết quả dương tính cao chỉ thị rằng phân phối nhị thức phân tán, nhưng càng có nhiều khả năng rằng đếm tế bào trung bình cao hơn đã dự đoán.

### C.2.4 Độ nhạy và độ đặc hiệu

Đối với mẫu thử không pha loãng, khoảng dung sai 99 % được giới hạn tới  $k = 763$ . Do đó, số lượng tổng số của dương tính đúng từ mẫu không pha loãng là 763 và số lượng âm tính giả là bốn. Từ các phần thử pha loãng, số lượng tổng số dương tính thu được và "tiêu chuẩn vàng" của các phòng thí nghiệm tương ứng được đếm như dương tính đúng. Do đó, có 1,442 dương tính đúng và ba âm tính giả. Số lượng âm tính đúng là 130 và không có dương tính giả được báo cáo. Do đó, độ nhạy của phương pháp đối với mẫu nguyên chất là 0,995 và đối với mẫu phụ đã pha loãng là 0,998; độ đặc hiệu vì thế gần tới 100 %.

### C.2.5 Kết luận

Các kết quả từ 26 phòng thí nghiệm tham gia cho thấy tính đồng nhất đáng kể, ngoại trừ dán nhãn sai trong một phòng thí nghiệm và các vấn đề về thao tác trong phòng thí nghiệm thứ hai. Không quan sát

**TCVN 9717:2013**

có sự khác biệt giữa việc sử dụng môi trường khác nhau (Bảng C.5) hoặc giữa mẫu được thử trong các ngày khác nhau. Thiếu các kết quả dương tính giả chỉ ra rằng phương pháp rất đặc thù và cho độ nhạy đủ để phát hiện số lượng vi khuẩn rất thấp thậm chí trong trường hợp các sinh vật nền ở mức cao. Phương pháp này được sử dụng thành công để phát hiện *Salmonella* từ mẫu nước sông đã nhiễm nước thải qua thời gian một tháng với chủng *Salmonella* trong phạm vi rộng được phát hiện (Bảng C.6).

**Bảng C.6 – Các chủng *Salmonella* từ mẫu nước sông nhiễm bản tự nhiên được phân lập bởi phòng thí nghiệm tham gia sử dụng phương pháp này (2005)**

<b>Chủng <i>Salmonella</i></b>	<b>Số phân lập</b>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	3
<i>Salmonella</i> Enteritidis	2
<i>Salmonella</i> Kentucky	1
<i>Salmonella</i> Kottbus	4
<i>Salmonella</i> Newport	4
<i>Salmonella</i> Chester	3
<i>Salmonella</i> Fresno	1
<i>Salmonella</i> Colindale	1
<i>Salmonella</i> Agone	4
<i>Salmonella</i> Virchow	3
<i>Salmonella</i> Falkensee	2
<i>Salmonella</i> Virginia	3
<i>Salmonella</i> Oakland	2
<i>Salmonella</i> Adane	1
<i>Salmonella</i> Muenchen	1
<i>Salmonella</i> Weltevreden	1
<i>Salmonella</i> Derby	1
<i>Salmonella</i> Bareilly	1
<i>Salmonella</i> Mbandka	2
<i>Salmonella</i> Saint-Paul	1
<i>Salmonella</i> Thompson	1
<i>Salmonella</i> Stanley	1
<i>Salmonella</i> Oranienburg	1
<i>Salmonella</i> Braenderup	1
<i>Salmonella</i> Unnamed	6

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 4851 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*
- [2] TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và sản xuất môi trường nuôi cấy – Phần 1: Hướng dẫn chung về đảm bảo chất lượng đối với việc chuẩn bị môi trường nuôi cấy trong phòng thử nghiệm.*
- [3] TCVN 8128-2 (ISO/TS 11133-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và sản xuất môi trường nuôi cấy – Phần 2: Các hướng dẫn thực hành về thử nghiệm hiệu năng của môi trường nuôi cấy.*
- [4] ISO/TR 13843:2000, *Water Quality – Guidance on validation of microbiological methods.*
- [5] PETERZ, M., WIBERG, C., NORBERG, P. *J. Appl. Bacteriol.* 1989, **66**, pp. 523-528
- [6] VASSILIADIS, P. *J. Appl. Bacteriol.* 1983, **54**, pp. 69-76
- [7] ROBERTSON, D.S.F. Selenium — A possible teratogen? *Lancet* 1970-03-07, i (7645), pp. 518-519
- [8] EWING, W.H., BALL, M.M. *The biochemical reactions of the genus Salmonella.* Atlanta, GA: National Communicable Disease Center, 1966
- [9] MURRAY, P.R., BARON, E.J., editors. *Manual of clinical microbiology*, 9th edition, 2 vols. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2007
- [10] POPOFF, M.Y., LE MINOR, L. *Antigenic formulas of the Salmonella serovars*, 8th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris: Institut Pasteur, 2001. 13 p.
-