

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 7850:2018

ISO 22964:2017

Xuất bản lần 2

**VI SINH VẬT TRONG CHUỖI THỰC PHẨM –
PHÁT HIỆN *CRONOBACTER* SPP.**

*Microbiology of the food chain –
Horizontal method for the detection of Cronobacter spp.*

HÀ NỘI – 2018

Lời nói đầu

TCVN 7850:2018 thay thế TCVN 7850:2008;

TCVN 7850:2018 hoàn toàn tương đương với ISO 22964:2017;

TCVN 7850:2018 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.

Lời giới thiệu

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện *Cronobacter* spp. trong thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và các mẫu môi trường. Những thay đổi chính, được liệt kê trong phần mở đầu, được giới thiệu trong tiêu chuẩn này so với phiên bản ISO/TS 22964:2006 được coi là chính [xem TCVN 11922 (ISO 17468)^[2]].

Do tính đa dạng của thực phẩm và thức ăn chăn nuôi nên phương pháp này có thể không thích hợp đến từng chi tiết cho từng sản phẩm cụ thể. Trong trường hợp này, có thể sử dụng các phương pháp khác đặc trưng cho từng sản phẩm, nếu thực sự cần thiết chỉ vì lý do kỹ thuật. Tuy nhiên, cần cố gắng áp dụng phương pháp này khi có thể.

Khi tiêu chuẩn này được soát xét thì phải tính đến mọi thông tin liên quan đến phạm vi mà phương pháp đếm đĩa này phải tuân theo và các nguyên nhân gây sai lệch so với phương pháp trong trường hợp các sản phẩm cụ thể.

Việc hài hoà các phương pháp thử không thể thực hiện được ngay và đối với một vài nhóm sản phẩm chính có thể tồn tại các tiêu chuẩn quốc tế và/hoặc tiêu chuẩn quốc gia mà không phù hợp với tiêu chuẩn này. Trong trường hợp có sẵn tiêu chuẩn quốc tế cho sản phẩm cần thử nghiệm thì phải tuân theo tiêu chuẩn đó. Thông thường khi các tiêu chuẩn như thế được soát xét, chúng phải được sửa đổi để phù hợp với tiêu chuẩn này, sao cho cuối cùng chỉ còn các sai lệch với phương pháp này là các lý do kỹ thuật được thừa nhận.

Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phát hiện *Cronobacter* spp.

Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of Cronobacter spp.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện *Cronobacter* spp.

Các hạn chế của phương pháp đã nêu trong lời giới thiệu, do đó tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho:

- các sản phẩm và thành phần thực phẩm dùng cho người và thức ăn chăn nuôi;
- các mẫu môi trường được lấy từ các cơ sở sản xuất hoặc xử lý thực phẩm.

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 6404 (ISO 7218), *Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc – Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.*

TCVN 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần), *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để 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 thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

TCVN 7850:2018

3.1

***Cronobacter* spp. (*Cronobacter* spp.)**

Vi sinh vật hình thành các khuẩn lạc điển hình trên thạch sinh màu phân lập *Cronobacter* (CCI) ^[10] và cho thấy các đặc tính sinh hóa quy định, khi các phép thử được tiến hành theo tiêu chuẩn này.

3.2

Phát hiện *Cronobacter* spp. (detection of *Cronobacter* spp.)

Việc xác định sự có mặt hay không có mặt *Cronobacter* spp. (3.1) trong một khối lượng hoặc thể tích sản phẩm hoặc trên một diện tích bề mặt khi các phép thử được tiến hành theo tiêu chuẩn này.

4 Các từ viết tắt

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các từ viết tắt sau đây:

BPW: nước đệm pepton (buffered peptone water)

CCI: sinh màu phân lập *Cronobacter* (chromogenic *Cronobacter* isolation)

CSB: canh thang chọn lọc *Cronobacter* (*Cronobacter* selective broth)

TSA: thạch đậu tương trypton (tryptone soya agar)

5 Nguyên tắc

5.1 Tiền tăng sinh không chọn lọc trong BPW

Cấy phần mẫu thử vào BPW và ủ ở 34 °C đến 38 °C trong 18 h ± 2 h.

CHÚ THÍCH: *Cronobacter* spp. có thể có mặt với lượng ít cùng với *Enterobacteriaceae* khác như *E.coliaceae* do đó có thể làm cản trở việc phát hiện.

5.2 Tăng sinh trong môi trường chọn lọc (CSB)

Cấy dịch cấy thu được trong 5.1 vào môi trường tăng sinh chọn lọc và ủ ở 41,5 °C ± 1 °C trong 24 h ± 2 h.

5.3 Cấy và nhận dạng trên thạch sinh màu (thạch CCI)

Cấy dịch cấy tăng sinh thu được trong 5.2 vào thạch sinh màu (CCI) và ủ ở 41,5 °C ± 1 °C trong 24 h ± 2 h.

5.4 Khẳng định

Các khuẩn lạc điển hình được chọn từ thạch sinh màu, cấy thuần trên thạch không chọn lọc như TSA và thử đặc tính sinh hoá.

6 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

Đối với thực hành phòng thử nghiệm, xem TCVN 6404 (ISO 7218) và TCVN 8128 (ISO 11133).

Thành phần của môi trường nuôi cấy, thuốc thử và cách chuẩn bị được nêu trong Phụ lục B.

Đối với thử nghiệm hiệu năng của môi trường nuôi cấy xem TCVN 8128 (ISO 11133) và/hoặc Phụ lục B.

7 Thiết bị, dụng cụ và vật tư

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

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

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

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

7.2 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ ở 34 °C đến 38 °C, 37 °C ± 1 °C và 41,5 °C ± 1 °C.

7.3 Que cấy vô trùng, đường kính khoảng 3 mm (dung tích 10 µl) và dung tích 1 µl và kim cấy hoặc vòng cấy.

7.4 Máy đo pH, có thể đo chính xác đến ± 0,1 đơn vị pH ở nhiệt độ 25 °C.

7.5 Bình hoặc chai, có nắp đậy, có dung tích thích hợp để sử dụng trong việc chuẩn bị canh thang tăng sinh, thạch và bảo quản chúng.

7.6 Pipet vô trùng có chia vạch hoặc pipet tự động, có dung tích danh định 10 ml, 1 ml và 0,1 ml.

7.7 Ống nghiệm (có nút hoặc nắp đậy) hoặc chai nuôi cấy, có dung tích thích hợp, nắp đậy bằng kim loại không độc có lớp lót hoặc nắp bằng chất dẻo dùng một lần [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

7.8 Đĩa Petri, đường kính xấp xỉ 90 mm.

7.9 Máy đo quang phổ, có thể đo độ hấp thụ ánh sáng với bước sóng 405 nm.

7.10 Cối và chày.

7.11 Tủ lạnh, có thể duy trì nhiệt độ ở 5 °C ± 3 °C

7.12 Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ từ 47 °C đến 50 °C và ở 37 °C ± 1 °C.

7.13 Tủ sấy khô (hoặc buồng sấy thông gió), có thể duy trì nhiệt độ từ 25 °C đến 50 °C.

8 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này, xem tiêu chuẩn cụ thể phù hợp cho sản phẩm có liên quan. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể thì các bên liên quan cần thỏa thuận về vấn đề này.

Nên lấy mẫu theo TCVN 11923 (ISO/TS 17728)^[3] đối với thực phẩm và thức ăn chăn nuôi và TCVN 8129 (ISO 18593)^[4] đối với các mẫu môi trường.

Điều quan trọng là phòng thử nghiệm phải nhận được đúng mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi chất lượng trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

9 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử từ mẫu phòng thử nghiệm theo tiêu chuẩn cụ thể có liên quan đến sản phẩm. Xem TCVN 6507 (ISO 6887) hoặc các tiêu chuẩn cụ thể phù hợp cho sản phẩm có liên quan. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể thì các bên có liên quan cần thỏa thuận về vấn đề này.

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

10.1 Phần mẫu thử

Thông thường, để chuẩn bị dịch pha loãng ban đầu, cho 10 g hoặc 10 ml mẫu thử (Điều 9) vào 90 ml môi trường tiền tăng sinh (B.1) (BPW) để thu được độ pha loãng mười lần. Làm ấm BPW đến nhiệt độ phòng trước khi sử dụng. Đối với các sản phẩm cụ thể, theo quy trình trong TCVN 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần). Đối với sữa thực hiện theo TCVN 6507-5 (ISO 6887-5).

Tiêu chuẩn này đã được xác nhận giá trị sử dụng đối với các phần mẫu thử 10 g. Có thể sử dụng phần mẫu thử nhỏ hơn mà không cần xác nhận giá trị sử dụng/kiểm tra xác nhận thêm với điều kiện là vẫn duy trì được cùng tỷ lệ giữa phần mẫu thử với canh thang tiền tăng sinh. Có thể sử dụng phần mẫu thử lớn hơn phần mẫu thử được xác nhận giá trị sử dụng ban đầu nếu nghiên cứu xác nhận giá trị sử dụng/kiểm tra xác nhận cho thấy không ảnh hưởng xấu đến việc phát hiện *Cronobacter* spp.

CHÚ THÍCH 1: Việc xác nhận giá trị sử dụng có thể thực hiện phù hợp với TCVN 12365 (ISO 16140) (tất cả các phần). Việc xác nhận giá trị sử dụng các mẫu gộp có thể thực hiện theo TCVN 6507-1 (ISO 6887-1), Phụ lục D (quy trình xác nhận giá trị sử dụng đối với phép thử định tính mẫu gộp).

CHÚ THÍCH 2: Các cỡ mẫu lớn có thể ảnh hưởng đến độ thu hồi *Cronobacter* spp. khi có mật hệ vi khuẩn gây nhiễu, như các probiotic^{[5], [6]}.

Để chuẩn bị các lượng lớn hơn 10 g, BPW cần được làm ấm trước đến khoảng từ 34 °C đến 38 °C (7.2) trước khi nuôi cấy các phần mẫu thử.

10.2 Tiền tăng sinh

Ủ mẫu đã cấy trong môi trường tiền tăng sinh (10.1) ở khoảng từ 34 °C đến 38 °C (7.2) trong 18 h ± 2 h.

10.3 Tăng sinh

Sau khi ủ mẫu thử được cấy trong môi trường tiền tăng sinh, trộn kỹ, chuyển 0,1 ml dịch cấy thu được (10.2) vào 10 ml môi trường CSB (B.2) và trộn kỹ. Ủ ở 41,5 °C (7.2) trong 24 h ± 2 h.

10.4 Phân lập *Cronobacter* spp. giả định

Nếu các đĩa CCI (B.3) được bảo quản ở nhiệt độ thấp hơn thì để cân bằng đến nhiệt độ phòng. Nếu cần, làm khô bề mặt đĩa thạch (7.13) theo quy trình nêu trong TCVN 8128 (ISO 11133).

Từ chủng cấy tăng sinh, trộn kỹ và dùng vòng cấy (7.3) cấy 10 µl lên bề mặt đĩa thạch CCI (B.3) để thu được các khuẩn lạc mọc riêng rẽ. Ủ đĩa ở 41,5 °C (7.2) trong 24 h ± 2 h.

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

Các khuẩn lạc *Cronobacter* điển hình trên thạch sinh màu CCI có màu xanh da trời đến màu lục lam (blue-green), cỡ nhỏ đến cỡ trung bình (1 mm đến 3 mm). Các khuẩn lạc không phải *Cronobacter* thường có màu trắng hoặc trắng với tâm màu xanh lá cây, xám hoặc đen. Một số khuẩn lạc không phải *Cronobacter* bất màu tự nhiên có thể có màu vàng hoặc đỏ.

10.5 Khẳng định

10.5.1 Yêu cầu chung

Để khẳng định, cấy truyền năm khuẩn lạc điển hình hoặc nghi ngờ đã được đánh dấu trên môi trường CCI chọn lọc (xem 10.4). Trong trường hợp các khuẩn lạc không mọc riêng rẽ, trước hết cần rìa cấy lại khuẩn lạc điển hình trên thạch chọn lọc (B.3).

Nếu trên đĩa có ít hơn năm khuẩn lạc điển hình hoặc nghi ngờ lấy tất cả các khuẩn lạc được đánh dấu để khẳng định.

Sử dụng các chủng cấy thuần để khẳng định sinh hóa.

10.5.2 Cấy thuần các khuẩn lạc

Rìa cấy các khuẩn lạc đã chọn lên bề mặt thạch không chọn lọc như TSA (B.4) để thu được các khuẩn lạc riêng rẽ.

Ủ các đĩa đã lật ngược ở nhiệt độ từ 34 °C đến 38 °C (7.2) trong 21 h ± 3 h.

TCVN 7850:2018

Nếu chủng cấy trên thạch không chọn lọc vẫn còn lẫn chủng chưa thuần thì cấy truyền một khuẩn lạc nghi ngờ sang một đĩa thạch không chọn lọc tiếp theo và ủ ở nhiệt độ 34 °C đến 38 °C (7.2) trong 21 h ± 3 h để thu được khuẩn lạc thuần khiết.

Nếu có thể, trước hết thử nghiệm với khuẩn lạc đặc trưng nhất từ đĩa thạch chọn lọc. Nếu dương tính, không cần kiểm tra các khuẩn lạc khác. Nếu âm tính, thực hiện tiếp với các khuẩn lạc được chọn khác cho đến khi phát hiện tất cả đều là âm tính hoặc dương tính.

Các khuẩn lạc có thể được giữ trên môi trường thạch không chọn lọc ở 5 °C (7.11), nhưng không để quá bảy ngày. Cần có các khuẩn lạc vừa mới cấy truyền trước khi thực hiện các phép thử khẳng định.

10.5.3 Khẳng định bằng sinh hoá

10.5.3.1 Yêu cầu chung

Tiến hành các phép thử khẳng định liệt kê trong Bảng 1.

Bảng 1 – Các phép thử khẳng định đối với *Cronobacter* spp.

Oxidase	Sinh axit từ:
Thủy phân cơ chất 4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside	D-Arabitol
L-Lysin decarboxylase	D-Sorbitol
L-Ornithin decarboxylase	D-Sucrose
Đỏ metyl (tùy chọn)	α -Methyl-D-glucosid (tùy chọn)
Voges-Proskauer (tùy chọn)	

CHÚ THÍCH 1: Nếu cho thấy đáng tin cậy, có thể sử dụng nhận dạng *Cronobacter* spp. bằng sinh hóa trong TCVN 6404 (ISO 7218).

CHÚ THÍCH 2: Có thể sử dụng các quy trình thay thế khác để khẳng định chủng phân lập là *Cronobacter* spp., với điều kiện là sự phù hợp của quy trình thay thế đã được xác nhận [xem thêm TCVN 6404 (ISO 7218)].

10.5.3.2 Oxydase

Sử dụng vòng cấy platin-iridi hoặc bằng chất dẻo (7.3), lấy một phần khuẩn lạc riêng rẽ từ mỗi đĩa (10.5.2) và ria lên giấy lọc đã làm ẩm với thuốc thử oxidase (B.5.1); màu tím hoa cà, màu tím hoặc màu xanh đậm xuất hiện trong vòng 10 s cho thấy phản ứng dương tính. Nếu sử dụng bộ kit thử oxidase có bán sẵn, cần thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

10.5.3.3 Thủy phân cơ chất 4 Nitrophenyl (PNP) α -D-glucopyranosid

Dùng que cấy (7.3) lấy từng khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch không chọn lọc như TSA (10.5.2) hòa vào 2 ml dung dịch muối sinh lý, 0,85 % NaCl (B.5.2.4). Thêm 2 ml dung dịch thử nghiệm enzym α -glucosidase (B.5.2). Ủ trong nồi cách thủy ở 37 °C (7.12) trong 4 h và đo màu vàng trong máy đo quang phổ (7.9) ở

bước sóng 405 nm. Độ hấp thụ sau 4 h tối thiểu là 0,3 ở 405 nm tương đương với 16 mM PNP, có thể được coi là dương tính.

10.5.3.4 L-Lysin decarboxylase

Dùng vòng hoặc que cấy (7.3) cấy từng khuẩn lạc đã chọn (10.5.2) vào ngay dưới bề mặt môi trường L-lysin khử nhóm carboxyl (B.5.3). Ủ các ống ở 37 °C (7.2) trong 24 h ± 2 h.

Màu tím sau khi ủ chứng tỏ phản ứng dương tính. Màu vàng là phản ứng âm tính.

10.5.3.5 L-Ornithin decarboxylase

Dùng que cấy (7.3) cấy từng khuẩn lạc đã chọn (10.5.2) vào ngay dưới bề mặt môi trường L-ornithine khử nhóm carboxyl (B.5.4). Ủ các ống ở 37 °C (7.2) trong 24 h ± 2 h.

Màu tím sau khi ủ chứng tỏ phản ứng dương tính. Màu vàng là phản ứng âm tính.

10.5.3.6 Lên men các loại carbohydrat khác nhau

Dùng que cấy (7.3) cấy từng khuẩn lạc đã chọn (10.5.2) vào ngay dưới bề mặt môi trường lên men carbohydrat (B.5.5). Ủ các ống ở 37 °C (7.2) trong 48 h ± 2 h.

Màu vàng sau khi ủ chứng tỏ phản ứng dương tính. Màu đỏ là phản ứng âm tính.

10.5.3.7 Đỏ metyl (MR) (tùy chọn)

Dùng vòng hoặc que cấy (7.3) cấy từng khuẩn lạc đã chọn (10.5.2) vào ngay dưới bề mặt môi trường canh thang MR-VP (B.5.6). Ủ các ống ở 37 °C (7.2) trong 48 h ± 2 h. Nhỏ năm giọt dung dịch đỏ metyl (B.5.6.2) vào mỗi ống. Màu đỏ chứng tỏ phản ứng dương tính. Màu vàng là phản ứng âm tính.

10.5.3.8 Voges-Proskauer (VP) (tùy chọn)

Dùng vòng hoặc que cấy (7.3) cấy từng khuẩn lạc đã chọn (10.5.2) vào ngay dưới bề mặt môi trường canh thang MR-VP (B.5.6). Ủ các ống ở 37 °C (7.2) trong 24 h ± 2 h. Thêm vào mỗi ống 0,2 ml dung dịch KOH 40 % (B.5.6.3.1) và 0,6 ml dung dịch 1-naphtol (B.5.6.3.2). Để yên 1 h ± 0,5 h. Màu hồng eosin xung quanh bề mặt môi trường chứng tỏ phản ứng dương tính.

10.6 Giải thích kết quả sinh hóa

Cronobacter spp. âm tính với oxisase và có thể thủy phân cơ chất 4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside và sinh axit từ sucrose. Chúng không khử nhóm carboxyl hóa của L-lysin và sinh axit từ D-sorbitol. Chỉ có rất ít chủng *Cronobacter* cho phản ứng đỏ metyl dương tính và hiếm khi cho phép thử Voges Proskauer âm tính. Có thể phân biệt *Cronobacter* spp. với các loài có quan hệ gần gũi bằng các đặc tính được liệt kê trong Phụ lục C.

CHÚ THÍCH: *Cronobacter* spp. được mô tả trong tài liệu tham khảo [9] và [11].

11 Biểu thị kết quả

Với các kết quả thử sinh hóa và diễn giải, nêu rõ có mặt hay không có mặt *Cronobacter* spp. trong x g hoặc x ml phần mẫu thử [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

12 Đặc tính hiệu năng của phương pháp

12.1 Nghiên cứu liên phòng

Độ chính xác (độ chụm) của phương pháp đã được xác định trong nghiên cứu liên phòng thử nghiệm để xác định độ đặc hiệu, độ chọn lọc và LOD₅₀ của phương pháp, khi có thể. Dữ liệu được nêu trong Phụ lục D. Các giá trị thu được từ nghiên cứu liên phòng này có thể không áp dụng được cho các loại thực phẩm khác với các loại thực phẩm nêu trong Phụ lục D.

12.2 Độ chọn lọc

Độ chọn lọc được xác định là số lượng mẫu cho kết quả dương tính chia cho số lượng mẫu được thử nghiệm ở nồng độ nhiễm đã biết. Các kết quả do đó phụ thuộc vào mức nhiễm của mẫu.

12.3 Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu được xác định là số lượng mẫu tìm thấy âm tính chia cho số lượng mẫu trắng được thử nghiệm.

12.4 LOD₅₀

LOD₅₀ là nồng độ (cfu/mẫu) mà tại đó khả năng phát hiện là 50 %.

13 Báo cáo thử nghiệm

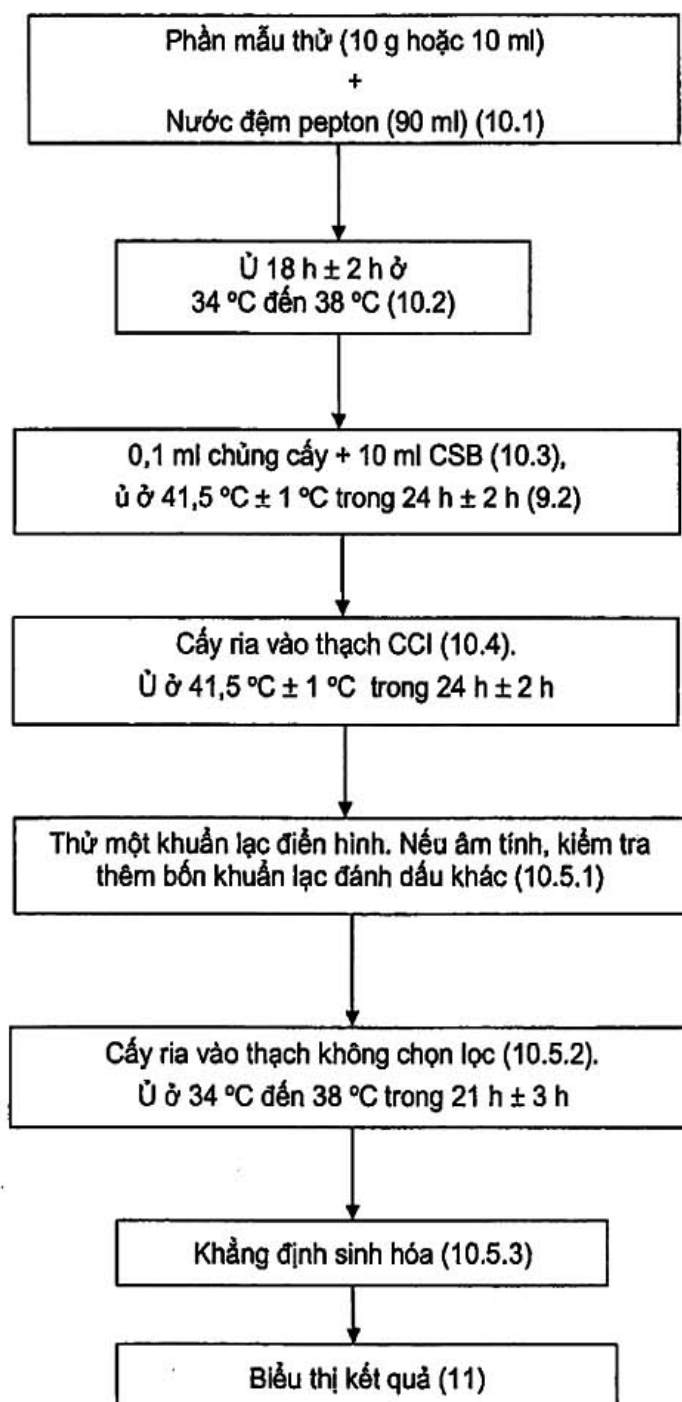
Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- b) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- c) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy lựa chọn cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- d) các kết quả thử nghiệm thu được;
- e) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;

Phụ lục A

(Quy định)

Sơ đồ của quy trình thử nghiệm

Hình A.1 – Sơ đồ quy trình phát hiện *Cronobacter* spp.

trong thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và mẫu môi trường từ cơ sở sản xuất thực phẩm

Phụ lục B

(Quy định)

Thành phần, chuẩn bị và thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy và thuốc thử

B.1 Nước đệm pepton (BPW)

B.1.1 Thành phần

Pepton ^a	10,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Dinatri hydro phosphat ngậm mười hai phân tử nước (Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O)	9,0 g
Kali dihydro phosphat (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
Nước	1 000 ml
^a ví dụ sản phẩm thủy phân casein bằng enzym.	

B.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước, bằng cách đun nóng, nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là $7,0 \pm 0,2$ ở 25 °C, nếu cần.

Phân phối môi trường vào các bình cầu (7.5) có dung tích thích hợp để thu được các lượng cần thiết cho phép phân tích.

Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực (7.1) ở 121 °C. Bảo quản môi trường trong các bình đậy kín ở 5 °C (7.11) đến 6 tháng.

B.2 Canh thang chọn lọc *Cronobacter* (CSB)

B.2.1 Môi trường cơ bản

B.2.1.1 Thành phần

Sản phẩm thủy phân mô động vật bằng enzym	10,0 g
Chất chiết thịt	3,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Tia Bromocresol	0,04 g
Sucrose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	10,0 g
Nước	1 000 ml

B.2.1.2 Chuẩn bị

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

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là $7,4 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần. Chuyển 10 ml môi trường cơ bản vào các ống (7.7). Khử trùng các ống trong nồi hấp áp lực (7.1) ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 min. Bảo quản môi trường ở $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (7.11) trong vòng 6 tháng.

B.2.2 Dung dịch vancomycin**B.2.2.1 Thành phần**

Vancomycin hydro clorua (số CAS 1404-93-9)	10 mg
Nước	10 ml

B.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan vancomycin trong nước cất. Trộn và khử trùng bằng cách lọc qua bộ lọc cỡ lỗ $0,2\text{ }\mu\text{m}$.

Dung dịch vancomycin có thể bền ở $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 ngày.

B.2.3 Môi trường hoàn chỉnh

Thêm 0,1 ml dung dịch vancomycin (B.2.2) một cách vô trùng vào 10 ml môi trường cơ bản (B.2.1) sao cho thu được nồng độ vancomycin cuối cùng là 10 mg/l CSB.

Môi trường CSB hoàn chỉnh có thể bền ở $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (7.11) trong 1 ngày.

B.3 Thạch phân lập *Cronobacter* sinh màu (CCI)**B.3.1 Thành phần**

Sản phẩm tryptic thủy phân casein	7,0 g
Chất chiết nấm men	3,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranosid	0,15 g
Natri desoxycholat ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$)	0,25 g
Sắt (III) amoni xitrat ($\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_7\text{FeNH}_3$)	1 g
Natri thiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	1 g
Thạch	9,0 g đến 18,0 g ^a
Nước	1000 ml

^a Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

TCVN 7850:2018

B.3.2 Chuẩn bị

Nghiền 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranosid với natri clorua trong cối (7.10) cho đến khi 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranosid tạo thành bột mịn. Hòa tan các thành phần khác trong nước bằng cách đun sôi, tắt nguồn nhiệt và thêm muối: hỗn hợp của 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranosid. Chính pH (7.4), sao cho sau khi khử trùng pH là $7,3 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

Khử trùng trong nồi hấp áp lực (7.1) ở 121°C trong 15 min. Làm nguội trong khoảng nhiệt độ từ 47°C đến 50°C . Rót khoảng 18 ml đến 20 ml môi trường thạch CCI vào các đĩa Petri (7.8) rộng vô trùng và để cho đông đặc trên mặt nằm ngang, mát.

Môi trường có thể giữ ở 5°C (7.11) lên đến 14 ngày.

B.4 Thạch đậu tương trypton (TSA) (ví dụ của môi trường không chọn lọc)

B.4.1 Thành phần

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

B.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan từng thành phần trong nước bằng cách đun sôi. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là $7,3 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực (7.1) ở 121°C . Làm nguội trong khoảng nhiệt độ từ 47°C đến 50°C . Rót khoảng 18 ml đến 20 ml TSA vào các đĩa Petri (7.8) rộng vô trùng và để cho đông đặc trên mặt phẳng nằm ngang, mát.

Bảo quản môi trường theo TCVN 8128 (ISO 11133).

B.5 Môi trường và thuốc thử đặc tính sinh hoá

B.5.1 Thuốc thử phát hiện oxidase

B.5.1.1 Thành phần

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

B.5.1.2 Chuẩn bị

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

B.5.2 Dung dịch thử enzym α -Glucosidase**B.5.2.1 Đệm phosphat, 0,3 M (pH 7,0)****B.5.2.1.1 Thành phần**

Natri phosphat monobasic ngậm 1 phân tử nước ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1,75 g
Natri phosphat dibasic ngậm 7 phân tử nước ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4,64 g
Nước	90 ml

B.5.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước vô trùng và bảo quản ở 5 °C (7.11) không quá 15 ngày.

B.5.2.2 Cơ chất 4-Nitrophenyl α -D-glucopyranosid**B.5.2.2.1 Thành phần**

4-Nitrophenyl α -D-glucopyranosid ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_8$)	0,4 g
Nước	10 ml

B.5.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan thành phần trong nước ở 50 °C ngay trước khi sử dụng.

B.5.2.3 Môi trường hoàn chỉnh

Cho 10 ml cơ chất 4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside (B.5.2.2) vào 90 ml dung dịch đệm phosphat (B.5.2.1) để đạt được nồng độ 4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside cuối cùng 0,4 g/100 ml dung dịch thử enzym α -glucosidase.

Dung dịch thử enzym α -glucosidase hoàn chỉnh có thể được giữ ở 5 °C (7.11) trong một ngày.

B.5.2.4 Dung dịch muối sinh lý 0,85 % NaCl**B.5.2.4.1 Thành phần**

Natri clorua (NaCl)	0,85 g
Nước	100 ml

TCVN 7850:2018

B.5.2.4.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước và bảo quản ở 5 °C (7.11) trong không quá 15 ngày.

B.5.3 Môi trường L-lysin khử nhóm carboxyl (decarboxylation)

B.5.2.1 Thành phần

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

B.5.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan từng thành phần trong nước bằng cách đun sôi, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là $6,8 \pm 0,2$ ở 25 °C. Phân phối 5 ml môi trường L-lysin khử nhóm carboxyl sang các ống nghiệm (7.7).

Khử trùng các ống nghiệm trong nồi hấp áp lực (7.1) ở nhiệt độ 121 °C trong 15 min. Bảo quản các ống đã rót ở 5 °C (7.11) đến 3 tháng.

B.5.4 Môi trường L-Ornithin khử nhóm carboxyl (decarboxylation)

B.5.4.1 Thành phần

L-Ornithin monohydroclorua ($C_5H_{12}N_2O_2.HCl$)	10 g
Chất chiết nấm men	3 g
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	1 g
Tia bromocresol	0,015 g
Nước	1 000 ml

B.5.4.2 Chuẩn bị

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

Phân phối 5 ml môi trường L-ornithin khử carboxyl vào các ống nghiệm (7.7). Khử trùng các ống đựng môi trường này trong nồi hấp áp lực (7.7) ở nhiệt độ 121 °C trong 15 min. Bảo quản các ống ở 5 °C (7.11) đến 3 tháng.

B.5.5 Môi trường lên men cacbohydrat (nước pepton có đồ phenol, D-arabitol, α -methyl-D-glucoside, D-sorbitol and D-sucrose)

B.5.5.1 Môi trường cơ bản

B.5.5.1.1 Thành phần

Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym	10 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Đồ phenol	0,02 g
Nước	1 000 ml

B.5.5.1.2 Chuẩn bị

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

Phân phối môi trường cơ bản này sang các bình cầu (7.5) có dung tích thích hợp. Khử trùng trong nồi hấp áp lực (7.1) ở nhiệt độ 121°C trong 15 min. Bảo quản môi trường ở 5°C (7.11) lên đến 6 tháng.

B.5.5.2 Dung dịch cacbohydrat D-arabitol ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$), α -Methyl-D-glucoside ($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_6$), D-sorbitol ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$) và D-sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), 80 mg/ml.

B.5.5.2.1 Thành phần

Cacbohydrat	8 g
Nước	100 ml

B.5.5.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan riêng rẽ bốn thành phần cacbohydrat trong nước để thu được bốn dung dịch cacbohydrat. Khử trùng tất cả dung dịch bằng cách lọc qua bộ lọc cỡ lỗ $0,2\ \mu\text{m}$. Bảo quản môi trường ở 5°C (7.11) lên đến 6 tháng.

B.5.5.3 Môi trường lên men cacbohydrat hoàn chỉnh

B.5.5.3.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (B.5.5.1)	875 ml
Dung dịch cacbohydrat (B.5.5.2)	125 ml

TCVN 7850:2018

B.5.5.3.2 Chuẩn bị

Đối với từng loại cacbohydrat, cho dung dịch cacbohydrat đã chuẩn bị (B.5.5.2) vào môi trường cơ bản (B.5.5.1) một cách vô trùng và trộn đều. Phân phối 10 ml môi trường hoàn chỉnh của từng cacbohydrat vào các ống nghiệm (7.7) vô trùng.

Môi trường cacbohydrat hoàn chỉnh cần được chuẩn bị trong ngày sử dụng.

B.5.6 Các hợp chất phản ứng Đỏ metyl (MR) và Voges-Proskauer (VP)

B.5.6.1 Môi trường cơ bản MR/VP

B.5.6.1.1 Thành phần

Sản phẩm thủy phân mô động vật bằng enzym	7 g
D-glucose	5 g
Dikalii hydro phosphat (K_2HPO_4)	5 g
Nước	100 ml

B.5.6.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan từng thành phần trong nước bằng cách đun sôi, nếu cần. Chỉnh pH, nếu cần, sao cho sau khi khử trùng pH là $6,9 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^\circ\text{C}$.

Phân phối 10 ml môi trường MR/VP này vào từng ống nghiệm (7.7). Hấp khử trùng môi trường này, trong nồi hấp áp lực (7.1) ở nhiệt độ $121\text{ }^\circ\text{C}$ trong 15 min. Bảo quản môi trường ở $5\text{ }^\circ\text{C}$ (7.11) lên đến 6 tháng.

B.5.6.2 Thuốc thử đỏ metyl (MR)

B.5.6.2.1 Thành phần

Đỏ metyl ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)	0,03 g
Etanol	85,5 ml
Nước	4,5 ml

B.5.6.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan đỏ metyl trong dung dịch etanol:nước. Không khử trùng, nếu cần. Bảo quản ở nhiệt độ phòng (từ $20\text{ }^\circ\text{C}$ đến $25\text{ }^\circ\text{C}$).

B.5.6.3 Thuốc thử Voges-Proskauer (VP)**B.5.6.3.1 Dung dịch KOH 40 %****B.5.6.3.1.1 Thành phần**

Kali hydroxit (KOH)	40 g
Nước	100 ml

B.5.6.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan kali hydroxit trong nước. Không khử trùng, nếu cần. Bảo quản ở nhiệt độ phòng (từ 20 °C đến 25 °C).

B.5.6.3.2 Dung dịch 1-naphthol 5 %**B.5.6.3.2.1 Thành phần**

1-naphthol (C ₁₀ H ₇ OH)	5 g
Etanol	100 ml

B.5.6.3.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan 1-naphthol trong etanol. Không khử trùng, nếu cần. Bảo quản ở nhiệt độ phòng (từ 20 °C đến 25 °C).

B.6 Phép thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy và thuốc thử

Thực hiện phép thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy và thuốc thử theo các phương pháp và tiêu chí quy định trong TCVN 8128 (ISO 11133), xem Bảng B.1.

Bảng B.1 – Phép thử hiệu năng để đánh giá chất lượng môi trường nuôi cấy

Môi trường	Loại ^a	Chức năng	Ù	Chủng kiểm chứng	Số WDCM ^c	Phương pháp kiểm soát	Tiêu chí	Phản ứng đặc trưng			
BPWg	L	Năng suất	(18 ± 2) h / 34 °C đến 38 °C	<i>Cronobacter sakazakii</i> <i>Cronobacter myijfensii</i>	00214 ^b 00213	Định tính	Độ đục (1-2) ^e	—			
CSB	L	Năng suất	(24 ± 2) h / (41,5 ± 1) °C	<i>Cronobacter sakazakii</i> + <i>Staphylococcus aureus</i> ^d	00214 ^b 00032 hoặc 00034	Định tính	Thay đổi màu của CSB > 10 khuẩn lạc/CCI	Màu vàng của CSB; Khuẩn lạc có màu xanh da trời đến màu lục lam, khối lượng nhỏ đến trung bình (1 mm đến 3 mm) trên CCI			
CCI	S	Chọn lọc	(24 ± 2) h / (41,5 ± 1) °C	<i>Staphylococcus aureus</i> ^d	00032 hoặc 00034	Định tính	Ức chế hoàn toàn hoặc ức chế một phần trên TSA ≤ 100 khuẩn lạc	CSB có màu tía			
CCI	S	Năng suất	(24 ± 2) h / (41,5 ± 1) °C	<i>Cronobacter sakazakii</i> <i>Cronobacter myijfensii</i>	00214 ^b 00213	Định tính	Phát triển tốt (2) ^f	Khuẩn lạc có màu xanh da trời đến màu lục lam, khối lượng nhỏ đến trung bình (1 mm đến 3 mm)			
									Chọn lọc	00032 hoặc 00034	Không phát triển (0) ^f

^a L = môi trường lỏng, S = môi trường rắn

^b Chủng tối thiểu phải sử dụng.

^c Danh mục chủng tham khảo có sẵn tại www.wfcc.info thông tin về số chủng cấy thu thập, chi tiết liên lạc WDCM: Trung tâm dữ liệu thế giới về vi sinh vật.

^d Chủng được tự do lựa chọn nhưng một trong số đó là chủng tối thiểu phải sử dụng.

^e Phân loại sự phát triển: 0: không phát triển; 1: hơi đục; 2: rất đục (xem TCVN 8128 (ISO 11133)).

^f Phân loại sự phát triển: 0: không phát triển; 1 phát triển yếu (ức chế một phần); 2: phát triển tốt (xem TCVN 8128 (ISO 11133)).

^g Môi trường dùng cho mọi mục đích, tham khảo TCVN 8128 (ISO 11133).

Phụ lục C
(Tham khảo)

Phân biệt *Cronobacter* spp. với các chi khác

Bảng C.1 – Phân biệt *Cronobacter* spp. với các chi khác

	<i>Cronobacter</i> ^a					<i>Enterobacter</i> và các loài có liên quan ^b							
	<i>C. dublinensis</i>	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. condimentii</i> / <i>C. muytjensii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. turicensis</i> / <i>C. universalis</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. cancerogenus</i>	<i>E. cloacae</i> ^c	<i>E. geroviae</i> ^c	<i>F. helveticus</i> ^d	<i>E. hormaechei</i>	<i>F. pulveris</i> ^d	<i>S. turicensis</i> ^d
Oxidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thủy phân 4-NP α -D-glucoside	100	100	100	100	100	0	0	1	0	100	0	100	100
Lysin decarboxylase	0	0	0	0	0	98	0	0	90	0	0	0	0
Ornithin decarboxylase	100	95	100	94	90	98	100	96	100	0	91	0	0
Đỏ methyl	0	0	0	1	0	5	0	5	5	91	57	83	100
Voges-Proskauer	100	100	100	99	100	98	100	100	100	9	100	17	0
Axit từ:													
D-Arabitol	17	0	0	0	10	100	0	15	97	91	0	83	100
α -Methyl-D-glucoside	100	100	0	100	100	95	0	85	2	0	83	0	0
D-Sorbitol	0	0	0	0	0	100	0	95	0	0	0	0	0
D-Sucrose	100	100	100	100	100	100	0	97	98	0	100	100	0

Chữ số biểu thị phần trăm chủng dương tính.

^a Từ Tài liệu tham khảo [7], [8], [9] và [11].

^b Từ Tài liệu tham khảo [12], [13] và [14].

^c Phần trăm tương tự thu được đối với các loài kết hợp *E. cloacae* khác. Ví dụ: *E. asburiae*, *E. amnigenus*, *E. intermedium*, *E. nimipressuralis* (riêng *E. nimipressuralis* không sinh axit từ D-sucrose).

^d *Franconibacter helveticus*, *Franconibacter pulveris* và *Sicciobacter turicensis* có thể xuất hiện như khuẩn lạc dương tính giả định trên thạch CCI.

^e Phần trăm tương tự thu được đối với *E. pyrinus*.

Phụ lục D

(Tham khảo)

Nghiên cứu xác nhận giá trị sử dụng phương pháp và đặc tính hiệu năng

D.1 Kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Các nghiên cứu liên phòng quốc tế gồm 14 đến 17 cộng tác viên từ 9 quốc gia đã tham gia thực hiện. Các nền mẫu được sử dụng để xác nhận giá trị sử dụng phương pháp này là các loại thực phẩm điển hình nhất, các thành phần hoặc các mẫu được điều tra về sự có mặt của *Cronobacter* spp.: bột sữa công thức cho trẻ sơ sinh; thức ăn công thức cho trẻ sơ sinh từ bột đậu nành; lactose; tinh bột và các mẫu môi trường. Các mẫu được kiểm tra ở hai mức độ nhiễm khác nhau kèm với kiểm chứng âm. Nghiên cứu được tổ chức vào năm 2013 bởi AINIA, Valencia, Tây Ban Nha, là một phần của CEN Mandate M/381 của Ủy ban châu Âu.

Tiêu chuẩn này đã được nghiên cứu liên phòng. Các bộ sưu tập nhỏ [xem TCVN 6404 (ISO 7218)] được sử dụng để khẳng định các khuẩn lạc. Các giá trị về đặc tính hiệu năng thu được từ các nghiên cứu liên phòng cho từng loại mẫu được nêu trong các Bảng D.1 đến D.5. Dữ liệu thu được từ một số cộng tác viên đã bị loại ra khỏi phép tính vì các lý do kỹ thuật đã được xác định rõ ràng (sai lệch so với quy trình quy định).

Mức dịch cấy trong các bảng tương ứng với phân tích số đếm đĩa của dịch cấy. Với các mẫu có ước tính LOD₅₀, lượng dịch cấy được sử dụng để tính toán là số có xác suất lớn nhất (MPN) được thực hiện trên các mẫu được cấy ở mức thấp.

Bảng D.1 – Kết quả phân tích dữ liệu thu được với sữa bột công thức cho trẻ sơ sinh

Đặc tính hiệu năng	Mẫu trắng	Mức nuôi cấy thấp 4 cfu/10 g	Mức nuôi cấy cao ^a 55 cfu/10 g
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	17	17	17
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau đánh giá dữ liệu	15	15	15
Số lượng mẫu trên mỗi phòng thử nghiệm	8	8	8
Số lượng mẫu còn lại sau đánh giá dữ liệu	120	88	120
Cỡ mẫu (g/ml/cm ² /đơn vị)	10	10	10
Độ nhạy, %	-	-	100
Độ đặc hiệu, %	99	-	-
LOD ₅₀ , cfu/phần mẫu thử (mức tin cậy 95 %)	-	1,1 (0,8 đến 1,4)	
^a Sữa bột công thức cho trẻ sơ sinh (có bán sẵn), chứa bifidobacteria ở mức từ 1,0 E+6 cfu/g đến 1,0 E+7 cfu/g, đã được nuôi cấy với <i>Cronobacter sakazakii</i> .			

**Bảng D.2 – Kết quả phân tích dữ liệu thu được
với thức ăn công thức cho trẻ sơ sinh từ bột đậu nành**

Đặc tính hiệu năng	Mẫu trắng	Mức nuôi cấy thấp 4 cfu/10 g	Mức nuôi cấy cao ^a 50 cfu/10 g
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	16	16	16
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau đánh giá dữ liệu	14	14	14
Số lượng mẫu trên mỗi phòng thử nghiệm	8	8	8
Số lượng mẫu còn lại sau đánh giá dữ liệu	109	112	112
Cỡ mẫu (g/ml/cm ² /đơn vị)	10	10	10
Độ nhạy, %	-	-	71 ^b
Độ đặc hiệu, %	99	-	-
LOD ₅₀ , cfu/phần mẫu thử	-	0,83 (0,66 đến 1,05)	
^a Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh từ bột đậu nành đã được cấy <i>Cronobacter sakazakii</i> . Chỉ <i>Enterobacter cloacae</i> (5 cfu/10 g) được nuôi cấy ở mức độ nhiễm cao hơn.			
^b Độ nhạy thấp khi phát hiện <i>Cronobacter</i> spp. ở mức cấy này là do <i>Enterobacter cloacae</i> phát triển quá mức làm khó khăn hơn cho việc chọn khuẩn lạc.			

Bảng D.3 – Kết quả phân tích dữ liệu thu được với lactose

Đặc tính hiệu năng	Mẫu trắng	Mức nuôi cấy thấp ^a 27 cfu/10 g	Mức nuôi cấy cao ^a 65 cfu/10 g
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	16	16	16
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau đánh giá dữ liệu	16	16	16
Số lượng mẫu trên mỗi phòng thử nghiệm	8	8	8
Số lượng mẫu còn lại sau đánh giá dữ liệu	128	128	128
Cỡ mẫu (g/ml/cm ² /đơn vị)	10	10	10
Độ nhạy, %	-	67 ^b	100
Độ đặc hiệu, %	99	-	-
LOD ₅₀ , (khoảng tin cậy 95 %) cfu/phần mẫu thử	-	Không xác định được	
^a Các mẫu lactose được cấy <i>Cronobacter turicensis</i> .			
^b Độ nhạy thấp khi phát hiện <i>Cronobacter</i> spp. ở mức cấy này là do vi khuẩn cấy mất khả năng sống quan sát được sau khi chuẩn bị mẫu.			

Bảng D.4 – Kết quả phân tích dữ liệu thu được với tinh bột

Đặc tính hiệu năng	Mẫu trắng	Mức nuôi cấy thấp ^a	Mức nuôi cấy cao ^a
		11 cfu/10 g	19 cfu/10 g
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	14	14	14
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau đánh giá dữ liệu	12	12	12
Số lượng mẫu trên mỗi phòng thử nghiệm	8	8	8
Số lượng mẫu còn lại sau đánh giá dữ liệu	128	128	128
Cỡ mẫu (g/ml/cm ² /đơn vị)	10	10	10
Độ nhạy, %	-	-	65 ^b
Độ đặc hiệu, %	100	-	-
LOD ₅₀ , cfu/phần mẫu thử	-	0,94 (0,73 đến 1,21)	

^a Các mẫu tinh bột được cấy *Cronobacter muytjensii*.

^b Độ nhạy thấp khi phát hiện *Cronobacter* spp. ở mức này là do mức cấy thấp hơn so với dự kiến có trong các mẫu này.

Bảng D.5 – Kết quả phân tích dữ liệu thu được với các mẫu môi trường

Đặc tính hiệu năng	Mẫu trắng ^a	Mức nuôi cấy thấp ^a	Mức nuôi cấy cao ^a
		28 cfu/10 g	95 cfu/10 g
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	15	15	15
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau đánh giá dữ liệu	10	10	10
Số lượng mẫu trên mỗi phòng thử nghiệm	8	8	8
Số lượng mẫu còn lại sau đánh giá dữ liệu	80	80	80
Cỡ mẫu (g/ml/cm ² /đơn vị)	Mẫu tắm bông	Mẫu tắm bông	Mẫu tắm bông
Độ nhạy, %	-	91	99
Độ đặc hiệu, %	100	-	-
LOD ₅₀ , cfu/phần mẫu thử	-	Không xác định được	

^a Các mẫu môi trường (tắm bông), có chứa vi khuẩn nhiễm tự nhiên (*Bacillus* spp. ở mức 1,0 E + 6 cfu/g) đã được nuôi cấy với *Cronobacter dublinensis* spp. *dublinensis*. Các mẫu trắng bị làm nhiễm với hỗn hợp *Franconibacter pulveris* và *Franconibacter helveticus*.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 12365 (ISO 16140) (tất cả các phần), *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Xác nhận giá trị sử dụng phương pháp*
- [2] TCVN 11922 (ISO 17468) *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Yêu cầu và hướng dẫn kỹ thuật để xây dựng hoặc soát xét phương pháp chuẩn*
- [3] TCVN 11923 (ISO/TS 17728), *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Kỹ thuật lấy mẫu để phân tích vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi*
- [4] TCVN 8129 (ISO 18593) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp lấy mẫu bề mặt sử dụng đĩa tiếp xúc và lau bề mặt*
- [5] BENNOUR MILED R., GUILLIER L., NEVES S., AUGUSTIN J.-C., COLIN P., GNANOU BESSE N. Individual cell lag time distributions of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) and impact of pooling samples on its detection in powdered infant formula. *Food Microbiol.* 2011, 28 pp. 648–655
- [6] BENNOUR MILED R., NEVES S., BAUDOIN N., LOMBARD B., DEPERROIS V., COLIN P., GNANOU BESSE N. Impact of pooling powdered infant formula samples on bacterial evolution and *Cronobacter* detection. *Int. J. Food Microbiol.* 2010, 138 pp. 250–259
- [7] FARMER JJ III. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: *Manual of Clinical Microbiology*, (Murray P.R., Barron E.J., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., eds.). ASM Press Inc, Washington, DC, Seventh Edition, 1999, pp. 442–58
- [8] IVERSEN C., LEHNER A., MULLANE N., MARUGG J., FANNING S., STEPHAN R., JOOSTEN H. The identification of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45 pp. 3814–3816
- [9] IVERSEN C., MULLANE N., MCCARDELL B., TALL B.D., LEHNER A., FANNING S., STEPHAN R., JOOSTEN H. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov. comb. nov., *C. malonaticus* sp. nov., *C. turicensis* sp. nov., *C. muyjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *dublinensis* subsp. nov., *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lausannensis* subsp. nov., and *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008, 58 pp. 1442–1447
- [10] IVERSEN C., DRUGGAN P., SCHUMACHER S., LEHNER A., FEER C., GSCHWEND K., JOOSTEN H., STEPHAN R. Development of a Novel Screening Method for the Isolation of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Appl. Environ. Microb.* 2008, 74 pp. 2550–2553

- [11] JOSEPH S., CETINKAYA E., DRAHOVSKA H., LEVICAN A., FIGUERAS M.J., FORSYTHE S.J. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat and *Cronobacter universalis* sp. nov., a novel species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies, recovered from a leg infection, water, and food ingredients. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012 June, **62** pp. 1277–1283
- [12] STEPHAN R., GRIM C.J., GOPINATH G.R., MAMMEL M.K., SATHYAMOORTHY V., TRACH L.H., CHASE H.R., FANNING S., TALL B.D. Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014, **64** pp. 3402–3410
- [13] STEPHAN R., VAN TRAPPEN S., CLEENWERCK I., IVERSEN C., JOOSTEN H., DE VOS P., LEHNER A. *Enterobacter pulveris* sp. nov. isolated from fruit powder, infant formula and infant formula production environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008, **58** pp. 237–241
- [14] STEPHAN R., VAN TRAPPEN S., CLEENWERCK I., VANCANNEYT M., DE VOS P., LEHNER A. *Enterobacter turicensis* sp. nov. and *Enterobacter helveticus* sp. nov. isolated from fruit powder. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007, **57** pp. 820–826
-