

[illegible]

CÔNG TY CP KHOA HỌC KỸ THUẬT TÂM ĐỨC	HƯỚNG DẪN VI SINH	Mã số: QT.2 Lần ban hành: 1 Ngày ban hành: 10-11-2018 Trang: 2/8
---	-------------------	--

I. MỤC ĐÍCH

- Tiêu chuẩn này qui định phương pháp phát hiện *Salmonella* trên đĩa thạch, trong đó có *Salmonella Typhi* và *Salmonella Paratyphi*.

II. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho :
- Các sản phẩm dùng cho người hoặc thức ăn chăn nuôi.
- Các mẫu môi trường trong khu vực sản xuất và xử lý thực phẩm.

III. THUẬT NGỮ VÀ ĐỊNH NGHĨA

IV. TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiêu chuẩn này được tham chiếu theo: TCVN 4829:2005 (ISO 6579:2002)

V. NỘI DUNG

1. Thiết bị và dụng cụ

- Cân kỹ thuật
- Tủ ấm, có khả năng ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ và $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Nồi hấp autoclave
- Nồi cách thủy: có thể hoạt động từ 44°C đến 47°C
- Máy dập mẫu Stomacher
- Thiết bị đếm khuẩn lạc
- Máy đo pH
- Đĩa petri
- Pipet 1ml.
- Que cấy vòng.
- Ống nghiệm, bình hoặc chai có dung tích thích hợp và không lớn hơn 500ml

2. Hóa chất và dung dịch hóa chất

- Môi trường tăng sinh sơ bộ không chọn lọc: Dung dịch đậm pepton

CÔNG TY CP KHOA HỌC KỸ THUẬT TÂM ĐỨC	HƯỚNG DẪN VI SINH	Mã số: QT.2 Lần ban hành: 1 Ngày ban hành: 10-11-2018 Trang: 3/8
---	--------------------------	--

Pepton từ casein	10.0g
Natri Clorua	5.0g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	9.0g
KH ₂ PO ₄	1.5g
Nước	1000ml

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

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là 7.0 ± 0.2 ở 25°C, nếu cần.

Phân phối 225ml hỗn hợp trên vào bình tam giác 250ml. Đậy nắp các bình. Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121°C.

b. Môi trường tăng sinh chọn lọc thứ nhất: Môi trường Rappaport-Vassiliadis với đậu tương (môi trường RVS):

=> Dung dịch A:

Pepton từ đậu tương	5.0g
Natri Clorua	8.0g
Kali dihydro phosphat (KH ₂ PO ₄)	1.4g
Dikali hydro phosphat (K ₂ HPO ₄)	0.2g
Nước	1000ml

Hòa tan các thành phần trong nước, đun nóng đến khoảng 70°C, nếu cần. Dung dịch này phải được chuẩn bị trong ngày cùng với việc chuẩn bị môi trường hoàn chỉnh RVS.

=> Dung dịch B:

MgCl ₂ .6H ₂ O	400.0g
Nước	1000ml

Hòa tan MgCl₂.6H₂O trong nước. Dung dịch này có thể được giữ trong lọ thủy tinh tối màu có nắp đậy kín ở nhiệt độ phòng ít nhất 2 năm.

• Dung dịch C:

Oxalat xanh malachit	0.4g
Nước	100ml

Hòa tan oxalat xanh malachit trong nước. Dung dịch này có thể được giữ trong lọ thủy tinh màu nâu ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 8 tháng.

CÔNG TY CP KHOA HỌC KỸ THUẬT TÂM ĐỨC	HƯỚNG DẪN VI SINH	Mã số: QT.2 Lần ban hành: 1 Ngày ban hành: 10-11-2018 Trang: 4/8
---	-------------------	--

- Môi trường hoàn chỉnh:

Dung dịch A	1000ml
Dung dịch B	100ml
Dung dịch C	10ml

Cho 100ml dung dịch B và 10ml dung dịch C vào 1000ml dung dịch A. Chỉnh pH sao cho khử trùng là 5.2 ± 0.2 , nếu cần. Phân phối các lượng 10ml vào các ống nghiệm trước khi sử dụng. Khử trùng 115°C trong 15 phút. Bảo quản môi trường đã chuẩn bị ở $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Sử dụng môi trường chuẩn bị trong ngày.

c. Môi trường tăng sinh chọn lọc thứ hai: Môi trường Novobioxin Tetrathionat Muller-kauffmann (môi trường MKTTn)

Cân 89.5g môi trường trong 1000ml nước chưng cất (theo nhà sản xuất). Không hấp áp lực

Hòa tan môi trường trong nước bằng cách đun nóng và khuấy liên tục cho đến khi môi trường sôi và thạch hòa tan. Không để quá nhiệt.

Chuyển ngay vào nồi cách thủy ở 44°C đến 47°C

Lọc khử trùng 20ml Iodine-Potassium iodide solution vào 100ml môi trường cơ bản đã được hấp khử trùng và làm nguội.

- Iodine-Potassium Iodide Solution:

Potassium iodide	5.0g
Iodine	4.0g
Nước	20ml

d. Môi trường đồ đĩa đặc chọn lọc :

Thạch Deoxycolat Lyzin Xyloza (thạch XLD)

Cân 55g môi trường trong 1000ml nước chưng cất (theo nhà sản xuất). Không hấp áp lực.

Hòa tan môi trường trong nước bằng cách đun nóng và khuấy liên tục cho đến khi môi trường sôi và thạch hòa tan. Không để quá nhiệt.

Chuyển ngay vào nồi cách thủy ở 44°C đến 47°C , khuấy và rót vào các đĩa. Để cho đông đặc.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô các đĩa thạch một cách cẩn thận.

Bảo quản các đĩa đã rót đến 5 ngày ở $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Thạch Hektoen Enteric Agar (thạch HE)

CÔNG TY CP KHOA HỌC KỸ THUẬT TÂM ĐỨC	HƯỚNG DẪN VI SINH	Mã số: QT.2 Lần ban hành: 1 Ngày ban hành: 10-11-2018 Trang: 5/8
---	-------------------	--

Cân 75g môi trường trong 1000ml nước chưng cất (theo nhà sản xuất). Không hấp áp lực.

Hòa tan môi trường trong nước bằng cách đun nóng và khuấy liên tục cho đến khi môi trường sôi và thạch hòa tan. Không để quá nhiệt.

Chuyển ngay vào nồi cách thủy ở 44°C đến 47°C, khuấy và rót vào các đĩa. Để cho đông đặc.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô các đĩa thạch một cách cẩn thận.

Bảo quản các đĩa đã rót đến 5 ngày ở 3°C ± 2°C

3. Quy định thực hiện QA/QC

Trong mỗi đợt phân tích nhân viên phân tích phải thực hiện những mẫu sau để đảm bảo kết quả phân tích:

Mẫu blank

Mẫu QC: Sử dụng chứng dương *Salmonella typhi* ATCC 14028

4. Quy trình phân tích

1. Tăng sinh sơ bộ không chọn lọc:

Cân 25g (hoặc 25ml) mẫu cần kiểm tra cho vào bình tam giác có chứa 225ml dung dịch đệm pepton đã được khử trùng.

Đối với mẫu Cacao và các sản phẩm có chứa cacao (ví dụ nhiều hơn 20%) : Thêm dung dịch đệm pepton tốt nhất là 50g/l casein (tránh sử dụng casein axit), hoặc 100g/l sữa bột gầy vô trùng, và sau khi ủ khoảng 2h, thêm 0,018g/l Brilliant Green nếu thực phẩm có nguy cơ bị nhiễm vi khuẩn Gram dương cao.

Đối với thực phẩm có tính axit và axit hóa: Đảm bảo rằng pH không thấp hơn 4,5 trong suốt quá trình tăng sinh sơ bộ. Có thể điều chỉnh được pH mà không cần sử dụng que thử pH vô trùng bằng cách thêm 0,1ml Bromocresol tím (dung dịch cồn 0,04%) vào 1000ml dung dịch đệm pepton. Bromocresol tím có màu thay đổi từ vàng thành tím với vùng chuyển màu là pH 5,2 – 6,8

Ủ ở 37°C ± 1°C trong 18h ± 2h

2. Tăng sinh chọn lọc:

Chuyển 0,1ml dịch tăng sinh sơ bộ thu được vào ống chứa 10ml môi trường RVS; chuyển 1ml dịch tăng sinh sơ bộ thu được vào ống chứa 10ml môi trường MKTTn.

Ủ môi trường RVS đã cấy dịch tăng sinh ở 41,5°C ± 1°C trong 24h ± 3h, và môi trường MKTTn đã cấy dịch tăng sinh ở 37°C ± 1°C trong 24h ± 3h.

3. Cấy lên đĩa chọn lọc:

CÔNG TY CP KHOA HỌC KỸ THUẬT TÂM ĐỨC	HƯỚNG DẪN VI SINH	Mã số: QT.2 Lần ban hành: 1 Ngày ban hành: 10-11-2018 Trang: 6/8
---	-------------------	--

Dùng que cấy vòng cấy chuyển từ dịch cấy thu được trong môi trường RVS và môi trường MKTTn lên bề mặt đĩa XLD sao để thu được các khuẩn lạc tách biệt rõ.

Làm tương tự với môi trường HE.

Ủ các đĩa XLD và các đĩa HE lật úp ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

Đọc kết quả:

=> Trên môi trường XLD :

- o Khuẩn lạc *Salmonella* điển hình mọc trên đĩa thạch XLD có tâm đen, quầng trong hoặc đỏ nhạt do sự đổi màu của chỉ thị.
- o *Salmonella* thay đổi âm tính H_2S mọc trên thạch XLD có màu hồng với tâm màu hồng đậm.
- o *Salmonella* dương tính lactose mọc trên thạch XLD là màu vàng có hoặc không có màu đen.

=> Trên môi trường HE: Khuẩn lạc có màu thay đổi từ xanh dương đến màu xanh lục, có hay không có tâm đen. Một số dòng *Salmonella* có tâm đen bóng rất lớn có thể chiếm gần hết khuẩn lạc.

4. Khả năng định:

• Chọn khuẩn lạc để khả năng định:

Để khả năng định, lấy từ mỗi đĩa ít nhất một khuẩn lạc điển hình và bốn khuẩn lạc tiếp theo nếu khuẩn lạc đầu tiên là âm tính.

Cấy rìa các khuẩn lạc đã chọn trên bề mặt các đĩa thạch dinh dưỡng đã được làm khô, sao cho các khuẩn lạc phân lập tốt phát triển được. Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

• Khả năng định sinh hóa:

- Thạch TSI: Cấy rìa trên bề mặt nghiêng của thạch và cấy đâm sâu xuống đáy. Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

=> Cấy đâm sâu

Màu vàng -> glucose dương tính (sử dụng glucose)

Màu đỏ hoặc không đổi màu -> glucose âm tính (không sử dụng glucose)

Màu đen -> sinh hydro sunfua

Bọt hoặc vết rạn -> sinh khí từ glucose.

=> Bề mặt nghiêng của thạch:

CÔNG TY CP KHOA HỌC KỸ THUẬT TÂM ĐỨC	HƯỚNG DẪN VI SINH	Mã số: QT.2 Lần ban hành: 1 Ngày ban hành: 10-11-2018 Trang: 7/8
---	-------------------	--

Màu vàng -> lactose và/hoặc sucrose dương tính (sử dụng lactose và/hoặc sucrose)

Màu đỏ hoặc không đổi màu -> lactose và sucrose âm tính (không sử dụng lactose cũng như không sử dụng sucrose)

- Thạch Urê: Cấy ria trên bề mặt nghiêng của thạch. Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{h} \pm 3\text{h}$

Phản ứng (+): sự phân giải urê thành ammoniac, làm phenol màu đỏ chuyển thành màu hồng và sau đó chuyển thành màu đỏ hồng. Phản ứng thường xuất hiện sau 2h đến 4h.

- Môi trường L-Lyzin đã khử nhóm cacboxyl: Cấy ngay phía dưới bề mặt của môi trường lỏng. Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

Phản ứng (+): Màu đục và đỏ tía sau khi ủ

Phản ứng (-): Màu vàng

- Phát hiện β -galactosidaza: Cho một vòng đầy các khuẩn lạc nghi ngờ vào ống có chứa 0,25ml dung dịch muối. Thêm 1 giọt toluene và lắc ống. Đặt ống này vào trong nồi cách thủy đặt ở 37°C trong 5 phút. Thêm 0.25ml thuốc thử β -galactosidaza và lắc đều. Đặt lại ống vào nồi cách thủy để ở 37°C trong $24\text{h} \pm 3\text{h}$, kiểm tra thường xuyên.

Phản ứng (+): xuất hiện màu vàng sau 20 phút.

- Môi trường phản ứng VP (Voges-Proskauer): Cho một vòng đầy các khuẩn lạc nghi ngờ cho vào ống chứa 3ml môi trường VP. Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{h} \pm 3\text{h}$. Sau khi ủ, thêm 2 giọt dung dịch creatin, 3 giọt dung dịch etylic 1-naphtol và sau đó thêm 2 giọt dung dịch kali hydroxit, lắc đều sau mỗi lần thêm từng loại thuốc thử.

Phản ứng (+): xuất hiện màu hồng đến màu đỏ sáng trong 15 phút.

- Môi trường phản ứng indol: Cấy khuẩn lạc nghi ngờ cho vào ống chứa 5ml môi trường trypton/tryptophan. Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{h} \pm 3\text{h}$. Sau khi ủ, thêm 1ml thuốc thử Kovacs.

Phản ứng (+): xuất hiện một vòng màu đỏ

Phản ứng (-): xuất hiện một vòng màu nâu vàng.

5. TÍNH KẾT QUẢ

Giải thích phản ứng sinh hóa và huyết thanh:

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

Xác nhận định danh:

Các chủng được xem là *Salmonella*, hoặc có thể là *Salmonella*, phải được gửi đến Trung tâm chuẩn *Salmonella* đã được công nhận để xác định typ.

Khi gửi đi để định dạng phải kèm theo tất cả thông tin liên quan đến các chủng đó và cho dù được tách ra từ thực phẩm hay từ vụ ngộ độc thực phẩm.