

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 7700-1:2007**

**ISO 11290-1:1996**

WITH AMENDMENT 1:2004

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN  
CHĂN NUÔI – PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN VÀ  
ĐỊNH LƯỢNG *LISTERIA MONOCYTOGENES* –**

**PHẦN 1: PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method  
for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes –*

*Part 1: Detection method*

HÀ NỘI – 2007

## **Lời nói đầu**

TCVN 7700-1:2007 hoàn toàn tương đương với ISO 11290-1:1996, sửa đổi 1:2004;

TCVN 7700-1:2007 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

TCVN 7700:2007 Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng *Listeria monocytogenes*, bao gồm:

- Phần 1: Phương pháp phát hiện;
- Phần 2: Phương pháp định lượng.

## Lời giới thiệu

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 hoàn toàn 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 cần 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 hòa các phương pháp thử có thể không thực hiện được ngay và đối với một vài nhóm sản phẩm 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 cho sản phẩm cần thử nghiệm thì phải tuân theo tiêu chuẩn đó. Thông thường khi các tiêu chuẩn như thế được soát xét, thì chúng phải được sửa đổi để phù hợp với tiêu chuẩn này, sao cho cuối cùng chỉ còn các sai lệch với phương pháp đếm đĩa này là các lý do kỹ thuật được thừa nhận.

**Vì sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi –****Phương pháp phát hiện và định lượng *Listeria monocytogenes* –****Phần 1: Phương pháp phát hiện**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method  
for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes –*

*Part 1: Detection method*

**CẢNH BÁO – Để đảm bảo an toàn cho nhân viên phòng thử nghiệm, cần chú ý rằng các phép thử phát hiện *Listeria monocytogenes* phải thực hiện trong các phòng thử nghiệm được trang bị đúng, dưới sự kiểm soát của các nhà vi sinh vật học có kinh nghiệm và hết sức thận trọng với công việc thải tất cả các nguyên vật liệu đã nuôi ấm. Đặc biệt, phụ nữ mang thai không được tiếp xúc trực tiếp với dịch cây *L. monocytogenes*.**

**1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp phát hiện *Listeria monocytogenes*.

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho các sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi như đã nêu trong lời giới thiệu.

**2 Tài liệu viện dẫn**

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 6507 (ISO 6887). Vị sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật

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

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

#### 3.1

##### ***Listeria monocytogenes* (*Listeria monocytogenes*)**

Vi sinh vật tạo thành các khuẩn lạc điển hình trên môi trường đặc chọn lọc và cho thấy rõ các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hoá như đã mô tả, khi tiến hành thử theo tiêu chuẩn này.

#### 3.2

##### **Phát hiện *Listeria monocytogenes* (Detection of *Listeria monocytogenes*)**

Xác định sự có mặt hay không có mặt các vi sinh vật, tính theo khối lượng hoặc theo thể tích sản phẩm, khi tiến hành thử theo tiêu chuẩn này.

### 4 Nguyên tắc

Trong giới hạn của tiêu chuẩn này thì việc phát hiện *L. monocytogenes* cần đến ít nhất bốn giai đoạn liên tiếp (Xem sơ đồ trong phụ lục A).

**CHÚ THÍCH 1** *Listeria spp.* có thể có mặt với một lượng nhỏ và thường đi kèm với một lượng lớn đáng kể các chi (loài) khác, do đó cần phải có bước tăng sinh chọn lọc. Cũng cần phát hiện các *Listeria spp.* bị tổn thương và môi trường tăng sinh chọn lọc ban đầu với chất ức chế có nồng độ giảm, được thực hiện ở cuối công đoạn này.

#### 4.1 Tăng sinh ban đầu trong môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc với các chất chọn lọc có nồng độ giảm (canh thang nửa Fraser)

Nuôi cấy môi trường tăng sinh chọn lọc ban đầu chứa một thể tích liti clorua và một nửa thể tích acriflavin và axit nalidixic (canh thang nửa Fraser), đồng thời canh thang này cũng được sử dụng làm dịch pha loãng cho phần mẫu thử (9.1).

Ủ phần mẫu thử ở 30 °C trong 24 giờ.

#### 4.2 Tăng sinh thứ cấp bằng môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc với các chất chọn lọc có nồng độ đầy đủ (canh thang Fraser)

Nuôi cấy môi trường thứ cấp tăng sinh lỏng nồng độ đầy đủ (canh thang Fraser) với dịch cấy thu được trong 4.1.

Ủ canh thang Fraser ở 35 °C hoặc 37 °C trong 48 giờ.

#### 4.3 Cấy đĩa và nhận dạng

Từ dịch cấy thu được trong 4.1 và 4.2, cấy đĩa trên hai môi trường đặc chọn lọc:

Thạch *Listeria* theo Ottaviani và Agosti (ALOA<sup>1)</sup>) (Xem [1] và B.3);

- bất kỳ môi trường đặc chọn lọc khác do phòng thử nghiệm chọn bổ sung cho Thạch *Listeria* theo Ottaviani và Agosti, như Oxford hoặc PALCAM.

Ü Thạch *Listeria* theo Ottaviani và Agosti ở  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  và kiểm tra sau 24 giờ  $\pm 3$  giờ, và sau 24 giờ  $\pm 3$  giờ tiếp theo, nếu cần, để kiểm tra sự có mặt các khuẩn lạc đặc trưng nghi ngờ là *L. monocytogenes*.

Ü môi trường chọn lọc thứ hai ở nhiệt độ thích hợp và kiểm tra môi trường này sau một khoảng thời gian tương ứng.

#### 4.4 Khẳng định

Cấy truyền các khuẩn lạc *L. monocytogenes* giả định lên đĩa theo 4.3 và khẳng định bằng các thử nghiệm hình thái, sinh lý và sinh hoá thích hợp.

### 5 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

#### 5.1 Khái quát

Về thực hành trong phòng thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

**CHÚ THÍCH 2** Do trong tiêu chuẩn sử dụng một lượng lớn môi trường nuôi cấy và thuốc thử, để cho nội dung tiêu chuẩn được gọn nên thành phần và cách chuẩn bị môi trường nuôi cấy và thuốc thử được đưa riêng vào trong phụ lục B.

#### 5.2 Môi trường tăng sinh chọn lọc ban đầu: Canh thang Fraster với các chất chọn lọc có nồng độ giảm (canh thang nửa Fraser)

Xem B.1.

#### 5.3 Môi trường tăng sinh chọn lọc thứ cấp: Canh thang Fraster với các chất chọn lọc có nồng độ đầy đủ (canh thang Fraser)

Xem B.2.

<sup>1)</sup> ALOA là một ví dụ về môi trường thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tổ chức ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các môi trường khác nếu chúng cho các kết quả tương đương.

## 5.4 Môi trường chọn lọc đặc đở dĩa

### 5.4.1 Môi trường thứ nhất: Thạch Listeria theo Ottaviani và Agosti (ALOA<sup>1)</sup>) [1]

Xem B.3.

### 5.4.2 Môi trường thứ hai

Việc chọn môi trường thứ hai là để cho phòng thử nghiệm tự chọn. Nếu sử dụng môi trường bán sẵn thì phải tuân thủ hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất một cách chính xác.

## 5.5 Môi trường nuôi cấy đặc: Thạch từ dịch chiết nấm men trypton đậu tương (TSYEA)

Xem B.5.

## 5.6 Môi trường nuôi cấy lỏng: Canh thang từ dịch chiết nấm men trypton đậu tương (TSYEB)

Xem B.6.

## 5.7 Thạch huyết cầu

Xem B.7.

## 5.8 Canh thang sử dụng cacbohydrat (ramnoza và xyloza)

Xem B.8.

## 5.9 Thạch di động (tùy chọn)

Xem B.9.

## 5.10 Môi trường CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) và các chủng xét nghiệm

Xem B.10.

## 5.11 Dung dịch hydro peroxit

Xem B.11.

## 5.12 Dung dịch muối đệm phosphat (PBS)

Xem B.12.

## 6 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

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:

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

**6.2 Tủ sấy hoặc tủ ấm**, có thể duy trì nhiệt độ từ  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  đến  $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**6.3 Tủ ấm**, có thể duy trì môi trường, các đĩa và các ống nghiệm trong dải nhiệt độ sau:

a) ở  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ;

b) ở  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  và

c) ở  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  hoặc  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**6.4 Nồi cách thuỷ**, có thể duy trì nhiệt độ ở  $47^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

**6.5 Que cấy vòng**, bằng hợp chất platin/iridin hoặc niken/crom, có đường kính khoảng 3 mm, và **que cấy** bằng cùng chất liệu, hoặc **đũa thuỷ tinh uốn cong một đầu** hoặc **que cấy vòng sử dụng một lần**.

**6.6 Máy đo pH**, có thể đọc chính xác tới 0,01 đơn vị pH ở nhiệt độ  $25^{\circ}\text{C}$  và có thể đo chính xác đến  $\pm 0,1$  đơn vị pH.

**6.7 Ống nghiệm hoặc bình thuỷ tinh**, có dung tích thích hợp, để khử trùng và bảo quản môi trường nuôi cấy và nuôi ấm môi trường lỏng.

**6.8 Ống đong**, dung tích 50 ml đến 1 000 ml, để chuẩn bị các dung dịch pha loãng và môi trường hoàn chỉnh.

**6.9 Pipet chia độ xả hết**, dung tích danh định 1 ml và 10 ml, được chia vạch tương ứng là 0,1 ml và 0,5 ml.

**6.10 Đĩa Petri**, đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

**6.11 Bình**, thích hợp cho việc ủ trong môi trường vi hiếu khí (tuỳ chọn).

**6.12 Hỗn hợp khí** (tuỳ chọn), có thành phần qui định dùng để ủ vi hiếu khí:

hàm lượng  $\text{CO}_2$  từ 5 % đến 12 %,  $\text{O}_2$  từ 5 % đến 15 % và  $\text{N}_2$  là 75 %

**6.13 Thiết bị dùng cho phép thử rọi Henry** (tuỳ chọn)

Xem phụ lục C.

6.14 Kính hiển vi, tốt nhất là loại phản pha, có lam kính và lamen (coverslip).

## 7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc bị biến đổi trong suốt quá trình vận chuyển và bảo quản.

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nếu không có tiêu chuẩn riêng về lấy mẫu sản phẩm có liên quan thì các bên tự thỏa thuận về vấn đề này.

## 8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo tiêu chuẩn riêng cho sản phẩm có liên quan. Nếu không có tiêu chuẩn riêng đó thì các bên tự thỏa thuận về vấn đề này.

## 9 Cách tiến hành

### 9.1 Phần mẫu thử và huyền phù ban đầu

Xem TCVN 6507 (ISO 6887) và tiêu chuẩn thích hợp đối với sản phẩm có liên quan.

Để chuẩn bị huyền phù ban đầu, sử dụng môi trường tăng sinh chọn lọc ban đầu được qui định trong 5.2, làm dịch pha loãng.

Nhìn chung, để chuẩn bị huyền phù ban đầu, cho  $x$  g hoặc  $x$  ml phần mẫu thử vào  $9x$  ml hoặc  $9x$  g môi trường tăng sinh chọn lọc ban đầu (5.2), để thu được tỷ lệ của phần mẫu thử và môi trường tăng sinh chọn lọc ban đầu là 1/10 (khối lượng/thể tích hoặc thể tích/thể tích).

### 9.2 Tăng sinh ban đầu

Ủ huyền phù ban đầu [6.3.b)], đã chuẩn bị theo 9.1, ở nhiệt độ 30 °C trong 24 giờ ± 2 giờ.

CHÚ THÍCH 3 Trong quá trình ủ huyền phù có thể xuất hiện màu đen.

### 9.3 Tăng sinh thứ cấp

9.3.1 Sau khi ủ huyền phù ban đầu (tăng sinh ban đầu) trong 24 giờ ± 2 giờ (9.2), chuyển 0,1 ml dịch cấy thu được trong 9.2 (không chú ý đến màu sắc của nó) vào ống nghiệm (6.7) chứa 10 ml môi trường tăng sinh thứ cấp (canh thang Fraser) (5.3).

9.3.2 Ủ môi trường đã cấy (9.3.1) trong 48 giờ ± 2 giờ ở nhiệt độ 35 °C hoặc 37 °C.

**CHÚ THÍCH 4** Nhiệt độ môi trường cấy cần được thống nhất giữa các bên có liên quan và ghi lại trong báo cáo kết quả thử nghiệm.

#### 9.4 Cấy ra đĩa và nhận dạng

**9.4.1** Từ dịch cấy tăng sinh ban đầu đã ủ 24 giờ ± 2 giờ ở 30 °C (9.2), dùng vòng cấy hoặc đũa thuỷ tinh (6.5) lấy một phần dịch cấy và cấy lên bề mặt môi trường đỗ đĩa chọn lọc thứ nhất, Thạch *Listeria* theo Ottaviani và Agosti (5.4.1), sao cho thu được các khuẩn lạc tách biệt tốt.

Tiến hành tương tự với môi trường đỗ đĩa chọn lọc thứ hai (5.4.2).

**9.4.2** Từ môi trường tăng sinh thứ cấp đã ủ 48 giờ ± 2 giờ ở 35 °C hoặc 37 °C (9.3.2), lặp lại các thao tác trong 9.4.1 với hai môi trường chọn lọc đỗ đĩa.

**9.4.3** Lật ngược các đĩa thu được trong 9.4.1 và 9.4.2 và đặt chúng vào tủ ấm đặt ở 37 °C đối với Thạch *Listeria* theo Ottaviani và Agosti (5.4.1) và ở nhiệt độ thích hợp đối với môi trường chọn lọc thứ hai (5.4.2). Nếu môi trường thứ hai được sử dụng là loại có bán sẵn thì theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

**9.4.4** Sau khi ủ 24 giờ ± 3 giờ (và tiếp 24 giờ ± 3 giờ nếu thấy khuẩn lạc mọc yếu hoặc không quan sát thấy khuẩn lạc nào mọc sau 24 giờ) đối với Thạch *Listeria* theo Ottaviani và Agosti hoặc trong một thời gian thích hợp (môi trường thạch chọn lọc thứ hai), kiểm tra các đĩa (9.4.3) về sự có mặt các khuẩn lạc ngờ ngờ là *Listeria* spp.

**9.4.4.1** Thạch *Listeria* theo Ottaviani và Agosti: các khuẩn lạc màu xanh được bao quanh bởi quầng sáng đặc (các khuẩn lạc điển hình) được coi là *L. monocytogenes*. Nếu mọc rất thưa, hoặc nếu không quan sát thấy khuẩn lạc nào, hoặc nếu sau khi ủ 24 giờ ± 3 giờ mà không có mặt khuẩn lạc điển hình nào, thì ủ lại các đĩa thêm 24 giờ ± 3 giờ.

**CHÚ THÍCH 1** Một số chủng *L. monocytogenes* cho thấy quầng sáng rất yếu (thậm chí không có quầng sáng) trong các trường hợp bị ức chế, cụ thể là ức chế bởi axit.

**CHÚ THÍCH 2** Một số chủng *L. monocytogenes* được đặc trưng bởi hoạt tính PIPCL (phospholipaza inositol phosphatidyl C) chậm. Các vi khuẩn như thế được phát hiện khi thời gian ủ tăng lên, ví dụ: 4 ngày. Một số chủng như thế có thể là loại gây bệnh (xem [2]).

**9.4.4.2** Môi trường chọn lọc thứ hai: Sau một khoảng thời gian thích hợp, kiểm tra xem có mặt hay không có mặt các *Listeria* spp. hoặc *L. monocytogenes* giả định theo các đặc trưng của chúng, tùy thuộc vào loại môi trường đã sử dụng.

## 9.5 Khẳng định *Listeria* spp

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

9.5.1.1 Để khẳng định, từ mỗi đĩa đựng mỗi loại môi trường chọn lọc (xem 9.4.4.1 và 9.4.4.2) lấy ra năm khuẩn lạc nghi ngờ là *Listeria* spp.

Nếu trên một đĩa có ít hơn năm khuẩn lạc thì lấy tất cả để khẳng định.

9.5.1.2 Ria cấy các khuẩn lạc đã chọn lên bề mặt đĩa thạch TSYEA (5.5) đã sấy khô trước sao cho các khuẩn lạc mọc tách biệt rõ.

Đặt các đĩa này trong tủ ấm [6.3 c)] ở 35 °C hoặc 37 °C trong 18 giờ đến 24 giờ, hoặc cho đến khi có các khuẩn lạc mọc.

CHÚ THÍCH 7 Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy do các bên tự thỏa thuận và phải được ghi vào báo cáo kết quả thử nghiệm.

Các khuẩn lạc điển hình có đường kính từ 1 mm đến 2 mm, lồi, không màu và toàn bộ mép mờ đục. Nếu các khuẩn lạc không tách biệt rõ thì lấy một khuẩn lạc *Listeria* điển hình cho vào một đĩa TSYEA khác. Tiến hành các phép thử sau đây trên các khuẩn lạc của dịch cấy thuần khiết trên TSYEA.

CHÚ THÍCH 8 Có thể thực hiện phép thử rời Henry (xem phụ lục C), nếu cần. Đối với phép thử này, thì quan trọng là môi trường thạch phải mỏng (15 ml/đĩa).

### 9.5.2 Phản ứng catalaza

Lấy một khuẩn lạc tách biệt tốt thu được trong 9.5.1.2 và hoà vào một giọt dung dịch hydro peroxit (5.11) trên lam kính. Sự hình thành ngay bọt khí chứng tỏ phản ứng dương tính.

### 9.5.3 Nhuộm gram

Tiến hành nhuộm gram các khuẩn lạc đã tách được trong 9.5.1.2. *Listeria* spp. biểu lộ Gram dương, dạng hình que ngắn và mảnh.

### 9.5.4 Thủ tính di động (nếu cần)<sup>2)</sup>

Lấy một khuẩn lạc tách biệt tốt thu được trong 9.5.1.2 và hoà vào ống nghiệm đựng TSYEB (5.6).

Ủ trong tủ ấm [6.3a)] để 8 giờ đến 24 giờ ở 25 °C cho đến khi quan sát thấy môi trường mờ đục.

<sup>2)</sup> Việc kiểm tra này là không cần thiết nếu người phân tích thường xuyên phân tích phát hiện *L. monocytogenes*.

Dùng vòng cấy (6.5) lấy một giọt dịch cấy ở trên cho lên lam kính hiển vi sạch bằng thuỷ tinh. Đậy lamen lên đỉnh và kiểm tra bằng kính hiển vi (6.14). *Listeria spp.* có dạng hình que ngắn, mảnh chuyển động hỗn loạn.

Các chủng vi khuẩn mọc ở nhiệt độ trên 25 °C có thể không cho thấy chuyển động này. Phải luôn luôn so sánh với một chủng vi khuẩn đã biết trước. Các dạng cầu, trực khuẩn lớn, hoặc các trực khuẩn chuyển động nhanh, dạng bơi thì không phải là *Listeria spp.*

Một phép thử khác để kiểm tra tính di động: sử dụng kim cấy (6.5) lấy dịch cấy từ khuẩn lạc điển hình trên thạch TSYEA (9.5.1.2) cấy đậm sâu vào môi trường thạch di động (5.9), Ủ 48 giờ trong tủ ấm [6.3 a)] để ở 25 °C.

Kiểm tra kiểu mọc xung quanh vết cấy. *Listeria spp.* là loại di động, cho kiểu mọc điển hình giống như cái ô. Nếu mọc chưa đủ, thì nuôi ấm thêm 5 ngày và kiểm tra lại vết cấy.

## 9.6 Khẳng định *L. monocytogenes*

### 9.6.1 Phép thử đặc tính phân giải huyết

**9.6.1.1** Nếu các đặc tính hình thái, sinh lý học và phản ứng catalaza cho thấy có *Listeria spp.*, thì cấy lên các đĩa thạch huyết cừu (5.7) để xác định phản ứng phân giải huyết.

Làm khô bề mặt thạch trước khi sử dụng. Lấy một khuẩn lạc điển hình tách biệt tốt trong 9.5.1.2 và dùng que cấy (6.5) chấm vào mỗi ô một khuẩn lạc. Đồng thời chấm các chủng kiểm tra dương tính (*L. monocytogenes*) và âm tính (*L. innocua*).

Sau khi ủ ở 35 °C hoặc 37 °C trong 24 giờ ± 2 giờ, kiểm tra các chủng từ mẫu thử và chuẩn so sánh. *L. monocytogenes* tạo ra các vùng sáng, trong và hẹp (phân giải huyết β)<sup>3)</sup>; (xem hình 1) *L. innocua* có thể tạo ra vùng không trong xung quanh vết chấm. Các *L. seeligeri* tạo ra vùng phân giải huyết yếu. Còn *L. ivanovii* thường tạo ra các vùng vạch trong, rộng trong vùng phân giải huyết β. Đặt các đĩa vào vùng rọi sáng để so sánh các chủng xét nghiệm với chủng chuẩn.

**9.6.1.2** Phản ứng phân giải huyết sử dụng huyết cầu cừu cũng có thể được thực hiện như sau:

Hoà một khuẩn lạc vào 150 µl TSYEB (B.6), Ủ 2 giờ ở 37 °C. Thêm 150 µl huyền phù huyết cầu cừu (B.4). Ủ ở 37 °C từ 15 phút đến 60 phút, rồi để khoảng 2 giờ trong tủ lạnh ở 3 °C ± 2 °C. Kiểm tra hoạt tính phân giải huyết cừu. Nếu không xác định được phản ứng thì để tiếp đến 24 giờ ± 3 giờ ở 3 °C ± 2 °C.

<sup>3)</sup> Điều này có thể thấy rõ hơn bằng cách chuyển bất kỳ một khuẩn lạc mọc trên bề mặt đĩa thạch xung quanh dịch cấy đánh dấu.

### 9.6.2 Sử dụng hydrat cacbon

Dùng que cấy vòng (6.5) lấy dịch cấy thu được từ TSYEB (9.5.4) cấy vào từng ống canh thang hydrat cacbon (5.8). Nuôi ấm ở 35 °C hoặc 37 °C đến 5 ngày. Các phản ứng dương tính (sinh axit) cho màu vàng và phần lớn xảy ra trong vòng từ 24 giờ đến 48 giờ.

### 9.6.3 Phép thử CAMP

Ria cấy các chủng *Staphylococcus aureus* và *Rhodococcus equi* (B.10.4) thành những vạch đơn ngang đĩa thạch huyết cùu (5.7 hoặc B.10.3) sao cho hai vệt cấy này song song và cân đối nhau trên đĩa (xem hình 1). Vết cấy cần phải mảnh và đều. Điều này được thực hiện bằng cách giữ que cấy vòng hoặc que cấy (6.5) vuông góc với mặt thạch.

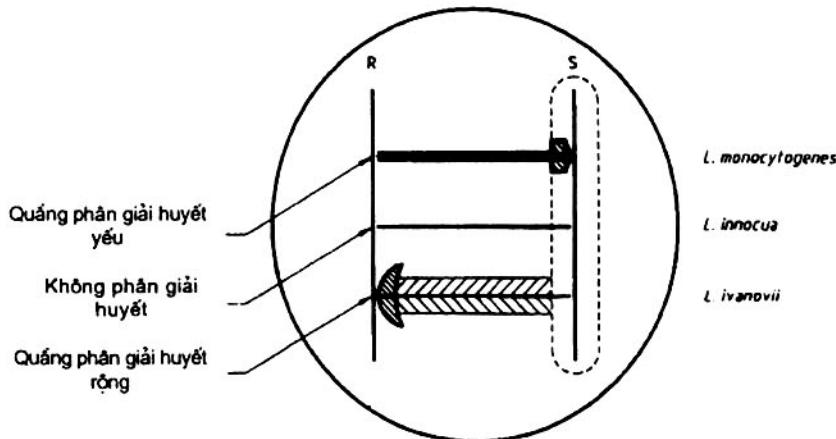
Ria cấy chủng xét nghiệm đã chuẩn bị trong 9.5.1.2 theo cách tương tự, vuông góc với các vệt cấy trên sao cho chủng xét nghiệm và các chủng cho phản ứng không chạm nhau nhưng phải rất gần nhau, cách nhau từ 1 mm đến 2 mm. Một vài chủng xét nghiệm có thể được ria cấy trên cùng một đĩa thạch.

Đồng thời, ria cấy các chủng đối chứng lần lượt từ *L. monocytogenes*, *L. innocua* và *L. ivanovii*. Nếu dùng thạch huyết (5.7), thì nuôi ấm các đĩa ở 35 °C hoặc 37 °C từ 18 giờ đến 24 giờ. Nếu dùng đĩa lớp kép (B.10.3) thì nuôi ấm các đĩa từ 12 giờ đến 18 giờ ở 35 °C hoặc 37 °C.

Vùng phản giải huyết β ở điểm giao nhau của chủng xét nghiệm với mỗi chủng *S. aureus* và *R. equi* tăng lên thì được coi là phản ứng dương tính.

Phản ứng dương tính với *R. equi* cho thấy một quầng phản giải huyết rộng (5 mm đến 10 mm) "hình đầu mũi tên". Phản ứng được coi là âm tính nếu một quầng phản giải huyết nhỏ trải ra chỉ khoảng 1 mm ở điểm giao nhau của chủng xét nghiệm và vùng khuếch tán của chủng *R. equi*.

Phản ứng dương tính với *S. aureus* cho thấy một vùng tròn nhỏ từ quầng phản giải huyết lan rộng hơn khoảng 2 mm so với chủng xét nghiệm và nằm trong vùng phản giải huyết yếu do sự phát triển của chủng *S. aureus*. Các vùng phản giải huyết rộng không xuất hiện xung quanh vệt cấy của chủng *S. aureus* và *L. monocytogenes*.



## CHÚ THÍCH

- Cấy các đĩa thạch huyết lớp mỏng (5.7 hoặc B.10.3). Các vạch thẳng đứng biểu thị các vết cấy của các chủng *S. aureus* (S) và *R. equi* (R). Các đường ngang biểu thị các vết cấy của chủng xét nghiệm. Các vùng gạch chéo cho thấy các vị trí quảng phân giải huyết tăng lên.
- Các vùng đánh dấu lấm chấm biểu thị vùng chịu ảnh hưởng của *S. aureus*.

**Hình 1 – Cấy và diễn giải các đĩa thử CAMP**

## 9.7 Diễn giải các đặc điểm hình thái và sinh lý và phản ứng sinh hoá

Tất cả các chủng *Listeria* spp. đều là các trực khuẩn nhỏ, Gram dương có tính di động. Chúng dương tính với catalaza. *L. monocytogenes* được phân biệt với các loài khác bằng các đặc trưng trong bảng 1.

## 9.8 Khẳng định cuối cùng

Các chủng được coi là *L. monocytogenes* (9.7) có thể gửi tới phòng thử nghiệm chuẩn *Listeria* đã được công nhận để khẳng định về huyết thanh học hoặc, nếu có thể, về kiểu loại tiêm tan. Việc gửi đến phòng thử nghiệm phải kèm theo tất cả các thông tin có liên quan đến các chủng này.

**Bảng 1 – Các phản ứng nhận biết *Listeria spp.***

Các loài	Phản giải huyết	Sinh axit		Thử CAMP	
		Ramnoza	Xyloza	S.aureus	R.equi
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i> loài phụ <i>grayi</i>	--	-	-	-	-
<i>L. grayi</i> loài phụ <i>murrayi</i>	-	V	-	-	-

v = phản ứng có thể thay đổi;  
(+)= phản ứng yếu;  
+ = > 90 % phản ứng dương tính;  
- = không phản ứng

**CHÚ THÍCH** Hiếm khi gặp các chủng *L. monocytogenes* không cho thấy phản giải huyết β hoặc phản ứng CAMP dương tính dưới các điều kiện qui định trong tiêu chuẩn này.

## 9.9 Các chủng kiểm chứng

Để kiểm tra tính năng của môi trường tăng sinh và môi trường nhận dạng, nhằm đảm bảo cho việc phát triển *L. monocytogenes*, cần cho dung dịch pha loãng mẫu chuẩn từ chủng *L. monocytogenes* mới phân lập và các chủng kiểm chứng âm tính (ví dụ: các *Streptococcus* dạng que) vào bình kiểm chứng đựng môi trường tăng sinh chọn lọc ban đầu (xem 9.2). Cho vào mỗi bình từ 10 tế bào đến 100 tế bào *L. monocytogenes* hoặc các chủng kiểm chứng âm tính.

Tiến hành với các bình kiểm chứng giống như đối với mẫu cấy xét nghiệm để chứng minh rằng thu được chủng kiểm tra dương tính.

## 10 Biểu thị kết quả

Theo diễn giải các kết quả, ghi lại sự có mặt hay không có mặt *Listeria monocytogenes* trong phần mẫu thử, theo khối lượng qui định bằng gam hay mililit mẫu thử.

**CHÚ THÍCH 10** Nếu các loài *Listeria* khác được tách biệt rõ, thì cũng có thể được ghi trong báo cáo kết quả thử nghiệm, nếu các bên có liên quan nhất trí.

## 11 Độ chum

### 11.1 Khái quát

Không thể biểu thị độ chum của phương pháp định tính bằng cách sử dụng các thông số độ lặp lại và độ tái lập mà chỉ có thể được tính bằng phương pháp định lượng. Do đó các tính năng thực hiện đã được lựa chọn (xem [3]). Các đặc trưng này là: độ đúng (độ nhạy đối với mẫu dương tính, tính đặc hiệu đối với mẫu âm tính), xác suất lặp lại và xác suất tái lập (xem 11.2, 11.3 và 11.4).

Các giá trị đặc trưng này đã được xác định bằng phép thử liên phòng thử nghiệm trên phương pháp, được tổ chức trong phạm vi của dự án Châu Âu (xem phụ lục D). Các đặc trưng thực hiện đã được xác định trên ba loại mẫu thực phẩm bị nhiễm bẩn ở các mức khác nhau và đối với mẫu chuẩn. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và chất nền khác với các giá trị đã nêu trong phụ lục D.

**CẢNH BÁO – Trong phương pháp thử này, việc phân lập đã được tiến hành trên thạch PALCAM và Oxford. Các dữ liệu về độ chum đưa ra một số hướng dẫn chung cho người sử dụng tiêu chuẩn này về cách thực hiện phương pháp và các dữ liệu về độ chum này có thể áp dụng cho tiêu chuẩn này khi môi trường thạch phân lập thứ hai không phải là PALCAM hoặc Oxford.**

### 11.2 Độ đúng

#### 11.2.1 Định nghĩa

Độ đúng là phần trăm mẫu thử được nhận dạng đúng.

Đối với các mẫu dương tính, độ đúng được gọi là độ nhạy và là phần trăm mẫu được nhận dạng đúng là dương tính. Đối với mục đích của phép tính này, thì phải thừa nhận rằng tất cả các mẫu dương tính giả định trong thực tế có chứa sinh vật này.

Đối với các mẫu âm tính, độ đúng được gọi là tính đặc thù và là phần trăm mẫu được nhận dạng đúng âm tính.

#### 11.2.2 Giá trị tổng thể

Như một chỉ thị chung của tính đặc thù (Sp), giá trị sau đây có thể được sử dụng khi thử nghiệm các mẫu thực phẩm nói chung: Sp = 97,4 %.

Như một chỉ thị chung của độ nhạy (Se), giá trị sau đây có thể được sử dụng khi thử nghiệm các mẫu thực phẩm nói chung : Se = 85,2 %.

Đối với các mẫu chuẩn (sử dụng các viên nang chứa 23 CFU, do RIVM, Hà Lan sản xuất), đã thu được giá trị sau đây: Se = 89,5 %.

Các giá trị này có thể được diễn giải là trong 85,2 % các trường hợp mẫu chứa *L. monocytogenes* được công nhận là dương tính khi được phân tích bằng phương pháp mô tả trong tiêu chuẩn này.

### 11.3 Xác suất lặp lại (Accordance)

#### 11.3.1 Định nghĩa

Xác suất lặp lại là phần trăm cơ hội tìm thấy kết quả tương tự (nghĩa là cả hai dương tính hoặc cả hai âm tính) từ hai phần mẫu thử giống hệt nhau được phân tích trong cùng một phòng thử nghiệm, trong các điều kiện lặp lại (nghĩa là do cùng một người thao tác, sử dụng cùng thiết bị và cùng thuốc thử trong một khoảng thời gian ngắn nhất có thể).

Do đó xác suất lặp lại là tương đương độ lặp lại đối với phương pháp định lượng.

Để tính xác suất lặp lại từ các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm, thì khả năng mà hai mẫu cho cùng kết quả được tính cho lần lượt từng phòng thử nghiệm tham gia và khả năng này là giá trị được tính trung bình cho tất cả các phòng thử nghiệm.

#### 11.3.2 Giá trị tổng thể

Là một chỉ thị chung của xác suất lặp lại (Ac), giá trị sau đây có thể được sử dụng khi thử nghiệm các mẫu thực phẩm nói chung: Ac = 88,7 %.

Đối với các mẫu chuẩn (sử dụng các viên nang chứa 23 CFU, do RIVM, Hà Lan sản xuất), đã thu được giá trị sau đây: Ac = 88,2 %.

Các giá trị này có thể được diễn giải rằng, nếu hai phần mẫu thử giống hệt nhau có chứa *L. monocytogenes* do cùng một người phân tích trong một khoảng thời gian ngắn và trong các điều kiện thao tác chính xác như nhau, có 88,7 % cơ hội thu được kết quả tương tự (có mặt *L. monocytogenes*) đối với hai phần mẫu thử.

### 11.4 Xác suất tái lập (Concordance)

#### 11.4.1 Định nghĩa

Xác suất tái lập là phần trăm cơ hội tìm thấy kết quả tương tự đối với hai mẫu thử giống hệt nhau được phân tích trong hai phòng thử nghiệm khác nhau.

Do đó, xác suất tái lập là tương đương độ tái lập đối với phương pháp định lượng.

Để tính xác suất tái lập từ các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm, mỗi quan sát trong mỗi phòng thử nghiệm tham gia được lấy lần lượt, kết cặp với các kết quả thu được đối với mẫu cụ thể của tất cả các phòng thử nghiệm khác. Xác suất tái lập là phần trăm của tất cả các cặp cho kết quả như nhau trên tất cả các cặp của dữ liệu.

#### **11.4.2 Giá trị tổng thể**

Là một chỉ thị chung của xác suất tái lập ( $C_c$ ), giá trị sau đây có thể được sử dụng khi thử nghiệm các mẫu thực phẩm nói chung:  $C_c = 84,4\%$ .

Đối với các mẫu chuẩn (sử dụng các viên nang chứa 23 CFU, do RIVM, Hà Lan sản xuất), đã thu được giá trị sau đây:  $C_c = 80,8\%$ .

Các giá trị này có thể được diễn giải rằng, nếu hai phần mẫu thử giống hệt nhau có chứa *L. monocytogenes* do hai phòng thử nghiệm thực hiện có 84,4 % cơ hội thu được kết quả tương tự (có mặt *L. monocytogenes*) đối với hai phần mẫu thử.

### **12 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ phương pháp đã sử dụng, nhiệt độ ủ và kết quả thu được. Báo cáo kết quả thử nghiệm cũng cần phải để cập đến tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc được xem là tuỳ ý, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Báo cáo thử nghiệm cũng bao gồm các thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử.

**Phụ lục A**

(qui định)

**Sơ đồ qui trình****Phản mẫu thử** $x$  g hoặc  $x$  ml

+

**Môi trường tăng sinh ban đầu (canh thang nửa Fraser) (5.2)**

$0,1$  ml dịch cấy trong  $10$  ml  
môi trường tăng sinh thứ cấp  
(canh thang Fraser) (5.3)  
(cấy truyền)

Ủ ở  $30^{\circ}\text{C}$  trong  $24$  giờ  $\pm 3$  giờ

Cấy ra đĩa

Ủ ở  $35^{\circ}\text{C}$  hoặc  $37^{\circ}\text{C}$  trong  $48$  giờ  $\pm 3$  giờ

Cấy ra đĩa

Thạch *Listeria* theo Ottaviani và Agosti (ALOA)  
(B.3) và  
môi trường chọn lọc thứ hai

Thạch *Listeria* theo  
Ottaviani và Agosti (ALOA)  
(B.3) và  
môi trường chọn lọc thứ hai

Ủ Thạch *Listeria* theo Ottaviani và Agosti trong  $24$   
giờ  $\pm 3$  giờ ở  $37^{\circ}\text{C}$  và tiếp theo  $24$  giờ  $\pm 3$  giờ nữa,  
nếu cần. Ủ môi trường chọn lọc thứ hai theo môi trường  
được chọn và hướng dẫn của nhà sản xuất

Ủ Thạch *Listeria* theo Ottaviani và Agosti trong  $24$   
giờ  $\pm 3$  giờ ở  $37^{\circ}\text{C}$  và tiếp theo  $24$  giờ  $\pm 3$  giờ nữa,  
nếu cần. Ủ môi trường chọn lọc thứ hai theo môi trường  
được chọn và hướng dẫn của nhà sản xuất

Khẳng định (9.5 đến 9.8)

Khẳng định (9.5 đến 9.8)

**Phụ lục B**

(qui định)

**Thành phần và cách chuẩn bị môi trường và thuốc thử****B.1 Môi trường tăng sinh chọn lọc ban đầu: Canh thang nửa Fraser****B.1.1 Môi trường cơ bản****B.1.1.1 Thành phần**

Pepton thịt (thủy phân pepsin của mô động vật)	5,0 g
Trypton (thủy phân peptic từ casein)	5,0 g
Cao thịt bò	5,0 g
Cao men	5,0 g
Natri clorua	20,0 g
Dinatri hydro phosphat ngậm hai phân tử nước	12,0 g
Kali dihydro phosphat	1,35 g
Aesculin	1,0 g
Nước	1 000 ml

**B.1.1.2 Chuẩn bị**

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

Chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng là  $7,2 \pm 0,2$ <sup>4)</sup> ở 25 °C, nếu cần.

Phân phối môi trường vào các bình cầu (6.7) có dung tích thích hợp để thu được các lượng cần thiết cho phép thử (xem 9.1).

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121 °C.

**CHÚ THÍCH 11** Có thể bổ sung dung dịch liti clorua (B.1.2) hoặc dung dịch axit nalidixic (B.1.3) vào môi trường cơ bản (B.1.1) trước khi hấp áp lực.

<sup>4)</sup> Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

### B.1.2 Dung dịch liti clorua

#### B.1.2.1 Thành phần

Liti clorua	3 g
Nước	10 ml

#### B.1.2.2 Chuẩn bị

Cho liti clorua vào nước.

Khử trùng bằng cách lọc.

**CẢNH BÁO – Cần phòng ngừa khi hòa tan liti clorua trong nước vì phản ứng tỏa nhiệt mạnh.**  
**Dung dịch này cũng kích thích màng nhầy.**

### B.1.3 Dung dịch muối natri của axit nalidixic

#### B.1.3.1 Thành phần

Muối natri của axit nalidixic	0,1 g
Natri hydroxit, dung dịch 0,05 mol/l	10 ml

#### B.1.3.2 Chuẩn bị

Hòa tan muối natri của axit nalidixic trong natri hydroxit.

Lọc để khử trùng.

### B.1.4 Dung dịch acriflavin hydrochlorua

#### B.1.4.1 Thành phần

Acriflavin hydrochlorua	0,25 g
Nước	100 ml

#### B.1.4.2 Chuẩn bị

Hòa tan acriflavin hydrochlorua trong nước.

Lọc để khử trùng.

**B.1.5 Dung dịch sắt (III) amoni xitrat****B.1.5.1 Thành phần**

Sắt (III) amoni xitrat	5,0 g
Nước	100 ml

**B.1.5.2 Chuẩn bị**

Hòa tan sắt (III) amoni xitrat trong nước.

Lọc để khử trùng.

**B.1.6 Môi trường hoàn chỉnh****B.1.6.1 Thành phần**

Môi trường cơ bản (B.1.1)	100 ml
Dung dịch liti clorua (B.1.2)	1,0 ml
Muối natri của axit nalidixic (B.1.3)	0,1 ml
Acriflavin hydrochlorua (B.1.4)	0,5 ml
Sắt (III) amoni xitrat (B.1.5)	1,0 ml

**B.1.6.2 Chuẩn bị**

Trước khi sử dụng, cho bốn dung dịch (B.1.2 đến B.1.5) vào từng phần 100 ml môi trường cơ bản (B.1.1).

**B.2 Môi trường tăng sinh chọn lọc thứ cấp: Canh thang Fraser****B.2.1 Môi trường cơ bản****B.2.1.1 Thành phần**

Pepton thịt (thủy phân peptic của mô động vật)	5,0 g
Trypton (thủy phân peptic từ casein)	5,0 g
Cao thịt	5,0 g
Cao men	5,0 g
Natri clorua	20,0 g
Dinatri hydro phosphat ngậm hai phân tử nước	12,0 g
Kali dihydro phosphat	1,35 g
Aesculin	1,0 g
Liti clorua	3,0 g
Muối natri của axit nalidixic	0,02 g
Nước	1 000 ml

**B.2.1.2 Chuẩn bị**

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần.

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

Chuyển môi trường vào ống nghiệm có dung tích thích hợp để thu được lượng cần thiết cho phép thử.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ .

**B.2.2 Dung dịch Acriflavin hydrochlorua**

Xem B.1.4.

**B.2.3 Dung dịch Sắt (III) amoni xitrat**

Xem B.1.5.

**B.2.4 Môi trường hoàn chỉnh**

Trước khi sử dụng, cho các phần 0,1 ml của các dung dịch B.2.2 và B.2.3 vào mỗi ống nghiệm đựng (các lượng 10 ml) môi trường cơ bản (B.2.1). Trộn nhẹ.

**B.3 Thạch *Listeria* theo Ottaviani và Agosti (ALOA<sup>5)</sup>)****B.3.1 Môi trường cơ bản****B.3.1.1 Thành phần**

Dịch thuỷ phân mô động vật bằng enzym	18 g
Dịch thuỷ phân casein bằng enzym	6 g
Cao men	10 g
Natri pyruvat	2 g
Glucoza	2 g
Magie glyxerolphosphat	1 g
Magie sulfat (khan)	0,5 g
Natri clorua	5 g
Liti clorua	10 g
Dinatri hydro phosphat (khan)	2,5 g
5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-glucopyranosit	0,05 g
Thạch	12 g đến 18 g <sup>a</sup>
Nước	930 ml <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

<sup>b</sup> 925 ml nếu sử dụng dung dịch amphotericin B (xem B.3.5.2).

<sup>5)</sup> ALOA là một ví dụ về môi trường thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tổ chức ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các môi trường khác nếu chúng cho các kết quả tương đương.

**B.3.1.2 Chuẩn bị**

Hòa tan các thành phần khô hoặc môi trường cơ bản hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121 °C.

Chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng là  $7,2 \pm 0,2$ , nếu cần.

**B.3.2 Dung dịch muối natri của axit nalidixic**

Muối natri của axit nalidixic	0,02 g
Natri hydroxit (dung dịch 0,05 mol/l)	5 ml

Hòa tan muối natri của axit nalidixic trong 5 ml natri hydroxit và lọc để khử trùng.

**B.3.3 Dung dịch xeftazidim**

Xeftazidim	0,02 g
Nước	5 ml

Hòa tan xeftazidim trong 5 ml nước và lọc qua màng 0,45 µm để khử trùng.

**B.3.4 Dung dịch polymyxin B**

Polymyxin B sulfat	76 700 IU
Nước	5 ml

Hòa tan polymyxin B trong 5 ml nước và lọc qua màng 0,45 µm để khử trùng.

**B.3.5 Kháng sinh bổ sung****B.3.5.1 Dung dịch cycloheximit**

Cycloheximit	0,05 g
Etanol	2,5 ml
Nước	2,5 ml

Hòa tan cycloheximit trong 2,5 ml etanol và sau đó thêm 2,5 ml nước. Lọc qua màng 0,45 µm để khử trùng.

**B.3.5.2 Dung dịch amphotericin B (làm dung dịch thay thế cho cycloheximit)**

Amphotericin B	0,01 g
HCl (1 mol/l)	2,5 ml
Dimetylformamit (DMF)	7,5 ml

Hòa tan amphotericin trong dung dịch HCl/DMF. Lọc qua màng 0,45 µm để khử trùng.

**CẢNH BÁO – Dung dịch HCl/DMF rất độc, cần thận trọng khi sử dụng.**

### B.3.6 Dung dịch bổ sung

Hòa tan 2 g L- $\alpha$ -phosphatidylinositol (Sigma P 6636 <sup>⑥)</sup>) trong 50 ml nước lạnh.

Khuấy khoảng 30 phút cho đến khi thu được dung dịch đồng nhất.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121 °C và làm nguội đến 48 °C đến 50 °C.

### B.3.7 Môi trường hoàn chỉnh

#### B.3.7.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (B.3.1)	930 ml *
Dung dịch axit nalidixic (B.3.2)	5 ml
Dung dịch xeftazidim (B.3.3)	5 ml
Dung dịch polymyxin B (B.3.4)	5 ml
Dung dịch xycloheximit (B.3.5.1) hoặc dung dịch amphotericin B (B.3.5.2)	5 ml 10 ml
Dung dịch bổ sung (B.3.6)	50 ml

\* 925 ml nếu sử dụng dung dịch amphotericin B.

#### B.3.7.2 Chuẩn bị

Cho các dung dịch trên vào môi trường cơ bản tan chảy ở khoảng 50 °C, trộn kỹ sau mỗi lần thêm.

pH của môi trường hoàn chỉnh phải là  $7,2 \pm 0,2$  ở 25 °C.

Môi trường hoàn chỉnh phải mờ đục đồng đều.

#### B.3.7.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Cho vào mỗi đĩa Petri từ 15 ml đến 20 ml môi trường hoàn chỉnh vừa mới chuẩn bị, rồi để cho đông đặc.

### B.3.8 Kiểm tra tính năng về đảm bảo chất lượng môi trường nuôi cấy

Đối với việc xác định tính chọn lọc và hiệu quả, xem ISO/TS 11133-2. Bảng B.1 đưa ra các chi tiết về kiểm tra tính năng đối với thạch *Listeria* theo Ottaviani và Agosti.

<sup>⑥</sup> P6636 là tên thương mại của sản phẩm do hãng Sigma cung cấp. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tổ chức ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng sản phẩm khác nếu chúng cho các kết quả tương đương.

**Bảng B.1 – Kiểm tra tính năng của Thạch theo Ottaviani và Agosti**

Chức năng	Ủ	Chủng kiểm chứng	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng	Chuẩn cứ	Phản ứng đặc trưng
Hiệu quả	48 giờ ở 37°C	<i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 13932 <sup>a</sup> và/hoặc <sup>b</sup> <i>L. monocytogenes</i> 1/2a ATCC 19111 (hoặc các chủng tương đương khác trong bộ sưu tập vi sinh đã được công nhận)	TSA	định lượng	PR≥ 0,5	khuẩn lạc màu xanh có quầng mờ đục
Tính đặc thù	48 giờ ở 37°C	<i>L. innocua</i> ATCC 33090 (hoặc các chủng tương đương khác trong bộ sưu tập vi sinh đã được công nhận)		định tính		khuẩn lạc màu xanh không có quầng mờ đục
Tính chọn lọc	48 giờ ở 37°C	<i>E.coli</i> ATCC 25922 hoặc 8739 <sup>a</sup> và/hoặc <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 hoặc 19433 (hoặc các chủng tương đương khác trong bộ sưu tập vi sinh đã được công nhận)		định tính	ít chế toàn phần	

a Chủng được sử dụng bởi phòng thử nghiệm (là tối thiểu)

b Cả hai chủng được sử dụng bởi nhà sản xuất ra môi trường.

#### B.4 Huyền phù huyết cầu cùu

Giữ tế bào huyết cùu ở  $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  trước khi sử dụng.

Trước khi sử dụng phải kiểm tra dấu hiệu phân giải huyết (bị đỗ) trong lớp huyết thanh phía trên.

Nếu không phân giải huyết, thì lấy 2 ml lớp tế bào đỗ phía dưới cho vào 98 ml dung dịch đệm PBS (B.12).

Nếu thấy xuất hiện phân giải huyết, thì hòa khoảng 4 ml lớp tế bào đỗ trong 10 ml dung dịch đệm PBS và trộn nhẹ, rồi ly tâm. Nếu thấy có lớp nổi phía trên màu đỏ chứng tỏ có sự phân giải huyết, thì không sử dụng nữa và loại bỏ huyền phù gốc này. Mặt khác, gạn lớp nổi phía trên và cho 2 ml huyền phù tế bào này vào 98 ml dung dịch đệm PBS.

Bảo quản huyền phù này đến 5 ngày ở  $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Nếu thấy xuất hiện phân giải huyết thi loại bỏ.

**B.5 Môi trường nuôi cấy đặc: Thạch từ dịch chiết nấm men trypton đậu tương (TSYEA)****B.5.1 Thành phần**

Canh thang trypton đậu tương <sup>1)</sup>	30 g
Cao men	6 g
Thạch	9 g đến 18 g <sup>2)</sup>
Nước	1 000 ml
<sup>1)</sup> Trypton	17,0 g
Pepton đậu tương	3,0 g
Natri clorua	5,0 g
Dikali hydro phosphat	2,5 g
Glucoza	2,5 g

<sup>2)</sup> Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

**B.5.2 Chuẩn bị**

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi.

Chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng là  $7,3 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , nếu cần.

Phân phối môi trường này vào các ống nghiệm có dung tích thích hợp để có được các lượng cần thiết cho phép thử.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ .

Để yên trong tư thế nghiêng.

Để chuẩn bị các đĩa thạch, phân phối vào các đĩa Petri vô trùng với các lượng môi trường thích hợp cho phép thử. Để yên cho đông đặc.

**B.6 Môi trường nuôi cấy lỏng: Canh thang từ dịch chiết nấm men trypton đậu tương (TSYEB)****B.6.1 Thành phần**

Canh thang trypton đậu tương <sup>1)</sup>	30 g
Cao men	6 g
Nước	1 000 ml
<sup>1)</sup> Xem B.5.1	

**B.6.2 Chuẩn bị**

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi, nếu cần.

Chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng là  $7,3 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , nếu cần.

Phân phối môi trường này vào các ống nghiệm hoặc bình có dung tích thích hợp để có được các lượng cần thiết cho phép thử.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ .

## B.7 Thạch huyết cùu

### B.7.1 Môi trường cơ bản

#### B.7.1.1 Thành phần

Pepton thịt	15 g
Dịch thuỷ phân gan	2,5 g
Cao men	5 g
Natri clorua	5 g
Thạch	9 g đến 18 g <sup>1)</sup>
Nước	1 000 ml

<sup>1)</sup> Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

#### B.7.1.2 Chuẩn bị

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

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

Phân phối môi trường này vào các bình có dung tích thích hợp để có được các lượng cần thiết cho phép thử.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ .

## B.7.2 Huyết cùu đã khử fibrin

### B.7.3 Môi trường hoàn chỉnh

#### B.7.3.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (B.7.1)	100 ml
Huyết cùu đã khử fibrin (B.7.2)	5 ml đến 7 ml

#### B.7.3.2 Chuẩn bị

Cho huyết cùu vào môi trường cơ bản đã làm nguội đến  $47^{\circ}\text{C}$ . Trộn đều.

Phân phối môi trường này vào các đĩa Petri vô trùng với các lượng thích hợp cho phép thử. Để yên cho đông đặc.

### B.8 Canh thang sử dụng cacbohydrat (ramnoza và xyloza)

#### B.8.1 Môi trường cơ bản

##### B.8.1.1 Thành phần

Pepton proteoza	10 g
Cao men	1 g
Natri clorua	5 g
Bromocresol tía	0,02 g
Nước	1 000 ml

##### B.8.1.2 Chuẩn bị

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

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

Phân phối môi trường này vào các ống nghiệm có dung tích thích hợp để có được các lượng cần thiết cho phép thử.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ .

#### B.8.2 Dung dịch hydrat cacbon

##### B.8.2.1 Thành phần

Hydrat cacbon <sup>1)</sup>	5 g
Nước	100 ml
<sup>1)</sup> L-Ramnosa hoặc D-xylosa	

##### B.8.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan riêng rẽ từng hydrat cacbon vào 100 ml nước.

Lọc để khử trùng.

#### B.8.3 Môi trường hoàn chỉnh

Thêm  $x$  ml dung dịch B.8.2 vào  $9x$  ml môi trường cơ bản (B.8.1) đối với từng loại hydrat cacbon.

## B.9 Môi trường thạch di động

### B.9.1 Thành phần

Pepton casein	20,0 g
Pepton thịt	6,1 g
Thạch	3,5 g
Nước	1 000 ml

### B.9.2 Chuẩn bị

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

Chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng là  $7,3 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , nếu cần.

Phân phối môi trường này với các lượng 5 ml vào các ống nghiệm.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ .

## B.10 Môi trường CAMP (Christie, Atkins, Munch-Paterson) và chủng xét nghiệm

Đối với phép thử này có thể sử dụng các đĩa thạch huyết cùu (B.7), nhưng tốt nhất là sử dụng các đĩa thạch hai lớp có lớp môi trường huyết cùu rất mỏng (xem B.10.3).

### B.10.1 Môi trường cơ bản

Xem B.7.1.

### B.10.2 Môi trường huyết cùu

Xem B.7.3.1.

### B.10.3 Môi trường hoàn chỉnh

Phân phối môi trường cơ bản (B.10.1) vào các đĩa Petri vô trùng, với các lượng khoảng 10 ml cho mỗi đĩa và để yên cho đông đặc. Rót đều một lớp rất mỏng môi trường huyết cùu (B.10.2) với các lượng không lớn hơn 3 ml trên một đĩa.

Để yên cho đông đặc. Nếu cho môi trường huyết cùu vào các đĩa môi trường cơ bản đã chuẩn bị trước, thì có thể phải làm ấm các đĩa này 20 phút bằng cách đặt chúng vào tủ ấm để ở  $37^{\circ}\text{C}$  trước khi rót lớp môi trường huyết cùu.

#### B.10.4 Các chủng phản ứng CAMP

Chủng phân giải huyết β của *S.aureus* (ví dụ: NCTC 1803 hoặc ATCC 25923) và chủng *R.equi* (ví dụ: NCTC 1621 hoặc ATCC 6939) cần phải qua phép thử CAMP. Không phải tất cả các chủng *S.aureus* đều thích hợp đối với phép thử CAMP.

Bảo quản các chất cấy gốc của *S. aureus*, *R. equi*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* và *L. ivanovii* bằng cách nuôi cấy lên môi trường TSYEA (B.5.2), nuôi ấm ở 35 °C hoặc 37 °C từ 24 giờ đến 28 giờ, hoặc cho đến khi thấy mọc và bảo quản trong tủ lạnh 3 °C ± 2 °C. Cấy truyền ít nhất một lần trong một tháng.

#### B.11 Dung dịch hydro peroxit

Sử dụng dung dịch 3 % (tính theo khối lượng).

#### B.12 Dung dịch muối đệm phosphat (PBS)

##### B.12.1 Thành phần

Dinatri hydro phosphat ngậm hai phân tử nước ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	8,98 g
Natri dihydro phosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	2,71 g
Natri clorua ( $\text{NaCl}$ )	8,5 g
Nước	1 000 ml

##### B.12.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước.

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

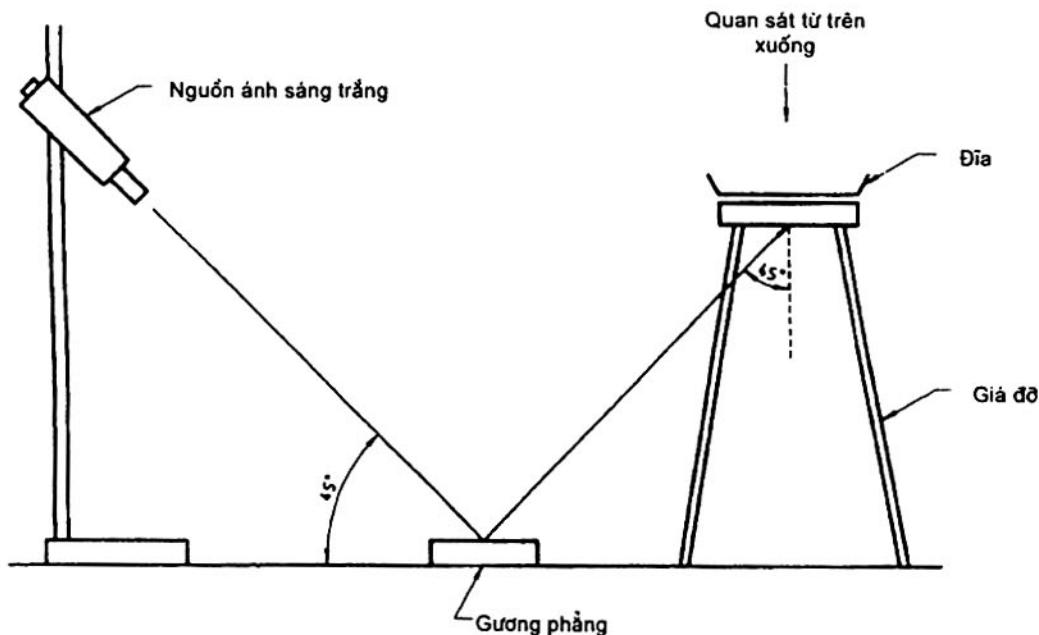
Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121 °C.

**Phụ lục C**

(tham khảo)

**Phép thử rọi Henry**

Kiểm tra các đĩa, sử dụng nguồn ánh sáng trắng, đủ sáng để rọi tốt các đĩa, rọi vào đáy đĩa một góc  $45^{\circ}$  (xem hình C.1). Khi được kiểm tra dưới ánh sáng truyền trêch góc này (rọi Henry) trực tiếp trên đĩa, thì các khuẩn lạc *Listeria spp* cho thấy có màu xanh nhạt và bề mặt nổi hạt.

**Hình C.1 – Kiểm tra các đĩa về khuẩn lạc nghi ngờ**

**Phụ lục D**

(tham khảo)

**Kết quả thử liên phòng thử nghiệm**

Một phép thử cộng tác quốc tế do Phòng thử nghiệm Khoa học Trung tâm của Bộ Nông nghiệp, Thủy sản và Thực phẩm Anh tổ chức năm 1998, trong phạm vi dự án Châu Âu SNT CT 962098 (xem [3], [4]). Trong phép thử này gồm có 19 phòng thử nghiệm của 14 nước Châu Âu và tiến hành thử trên phomat tươi, thịt xay, bột trứng và mẫu chuẩn. Các mẫu thực phẩm, mỗi loại được kiểm tra ở hai mức nhiễm bẩn khác nhau và mẫu kiểm chứng âm tính. Các mẫu này đều bị nhiễm cả *L. monocytogenes* và *L. innocua* (Xem bảng D.1), nghĩa là có độ nhạy thấp. Do thiếu các nguồn cần thiết của các phòng thử nghiệm để tham gia vào phép thử này, mà đã không thể sử dụng cả hai môi trường phản lập Oxford và PALCAM cho tất cả các phòng thử nghiệm: 11 phòng đã sử dụng môi trường PALCAM và 9 phòng đã sử dụng môi trường Oxford.

**Bảng D.1 – Các mẫu nhiễm bẩn**

Các vi sinh vật (trong 25 g)	Mẫu trắng	Nhiễm mức thấp	Nhiễm mức cao
<i>L. monocytogenes</i>	-	5 đến 100	50 đến 100
<i>L. innocua</i>	50 đến 100	5 đến 100	50 đến 100
Hệ sinh vật bản địa		+	+

Các giá trị về đặc trưng tính năng thu được từ phép thử cộng tác này cho thấy đối với từng loại mẫu trong các bảng từ D.2 đến bảng D.5. Các dữ liệu thu được với thạch Oxford và PALCAM đã được gộp lại. Dữ liệu thu được từ một số phòng thử nghiệm đã được loại ra khỏi tính toán, chỉ với các lý do kỹ thuật nhận biết rõ (lệch khỏi qui trình).

**Bảng D.2 – Kết quả phân tích dữ liệu thu được với các mẫu bột trứng khô**

	<b>Mẫu</b> <b>(mức nhiễm bẩn)</b>		
	<b>Bột trứng khô</b> <b>(không nhiễm)</b>	<b>Bột trứng khô</b> <b>(nhiễm ở mức thấp)</b>	<b>Bột trứng khô</b> <b>(nhiễm ở mức cao)</b>
Năm thực hiện phép thử liên phòng thử nghiệm	1998	1998	1998
Số lượng phòng thử nghiệm trả lại kết quả	18	18	18
Số lượng mẫu trên một phòng thử nghiệm	5	5	5
Số lượng phòng thử nghiệm bị loại	1	1	1
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi loại trừ	17	17	17
Số lượng mẫu được chấp nhận	85	85	85
Độ đúng (tính đặc hiệu), %	97,9	-	-
Độ đúng (độ nhạy), %	-	53,7	88,4
Xác suất lặp lại, %	96,6	58,7	86,5
Xác suất tái lập, %	95,8	49,8	79,1

**Bảng D.3 – Kết quả phân tích dữ liệu thu được với các mẫu thịt xay**

	<b>Mẫu</b> <b>(mức nhiễm bẩn)</b>		
	<b>Thịt xay</b> <b>(không nhiễm)</b>	<b>Thịt xay</b> <b>(nhiễm ở mức thấp)</b>	<b>Thịt xay</b> <b>(nhiễm ở mức cao)</b>
Năm thực hiện phép thử liên phòng thử nghiệm	1998	1998	1998
Số lượng phòng thử nghiệm trả lại kết quả	18	18	18
Số lượng mẫu trên một phòng thử nghiệm	5	5	5
Số lượng phòng thử nghiệm bị loại	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi loại trừ	16	16	16
Số lượng mẫu được chấp nhận	80	80	80
Độ đúng (tính đặc hiệu), %	97,8	-	-
Độ đúng (độ nhạy), %	-	83,3	100,0
Xác suất lặp lại, %	97,3	81,3	100,0
Xác suất tái lập, %	95,6	71,7	100,0

**Bảng D.4 – Kết quả phân tích dữ liệu thu được với các mẫu phomat tươi**

	<b>Mẫu</b> (mức nhiễm bẩn)		
	<b>Phomat tươi</b> (không nhiễm)	<b>Phomat tươi</b> (nhiễm ở mức thấp)	<b>Phomat tươi</b> (nhiễm ở mức cao)
Năm thực hiện phép thử liên phòng thử nghiệm	1998	1998	1998
Số lượng phòng thử nghiệm trả lại kết quả	16	16	16
Số lượng mẫu trên một phòng thử nghiệm	5	5	5
Số lượng phòng thử nghiệm bị loại	1	1	1
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi loại trừ	15	15	15
Số lượng mẫu được chấp nhận	75	75	75
Độ đúng (tính đặc hiệu), %	96,5	-	-
Độ đúng (độ nhạy), %	-	85,9	100,0
Xác suất lặp lại, %	94,4	84,0	100,0
Xác suất tái lập, %	93,1	75,2	100,0

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

	<b>Mẫu</b> (Mức nhiễm)
	<b>Mẫu chuẩn</b> (Các vien nang chứa 23 CFU)*
Năm thực hiện phép thử liên phòng thử nghiệm	1998
Số lượng phòng thử nghiệm trả lại kết quả	18
Số lượng mẫu trên một phòng thử nghiệm	5
Số lượng phòng thử nghiệm bị loại	1
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi loại trừ	17
Số lượng mẫu được chấp nhận	85
Độ đúng (tính đặc hiệu), %	-
Độ đúng (độ nhạy), %	89,5
Xác suất lặp lại, %	88,2
Xác suất tái lập, %	80,8

\* Do RIVM, Hà Lan chuẩn bị cho phép thử.

## Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] OTTAVIANI, F., OTTAVIANI, M., AGOSTI, M. Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. *Quimper Froid Symposium Proceedings*, P6 ADRIA Quimper, 16-18 June, 1997
  - [2] LECLERCQ, A. Colonial atypical morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PACAM, Rapid'L. mono and ALOA solid media. *J.Microbiol. Methods*, **57**, 2004, pp. 251-258
  - [3] Report of the trial "Detection of *Listeria monocytogenes* according to EN ISO 11290-1:1997", available from CSL, Sand Hutton, YO4 1LZ, York, UK, 1999
  - [4] SCOTTER, S., LANGTON, S., LOMBARAD, B., LAHELLEC, C., SCHULTEN, S., NAGELKERKE, N., IN'T VELD, P., ROLLIER, P. and BOHNERT, M. validation of ISO method 11290 – Part 1: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, **64**, 2001, pp. 259-306
  - [5] OTTAVIANI, F., OTTAVIANI, M., AGOSTI, M. Esperienza su un agar selettivo e differenziale per *L. mono*. *Industrie Alimentari*, 1997
  - [6] ISO/TS 11133-2, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.*
-