

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.0005</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: <b>01//03/2017</b> Trang:1/14
--	----------------------------	---

## **PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN *SALMONELLA* TRÊN ĐĨA THẠCH**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Lê Thuỳ Quyên	Trần Thái Vũ	Trần Thái Vũ

### **THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU**

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
<b>1</b>		Thay đổi SOP	<b>01/03/2017</b>

<p><b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b></p>	<p><b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b></p>	<p>Mã số: <b>HD.VS.0005</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: <b>01/03/2017</b> Trang: 2/14</p>
---	-----------------------------------	---

## **A. TỔNG QUAN**

### **I. Phạm vi áp dụng**

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

### **II. Tài liệu tham khảo**

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

### **III. Nguyên lý phương pháp**

Quy trình phát hiện *Salmonella* cần qua bốn giai đoạn kế tiếp nhau:

- Tăng sinh sơ bộ trong môi trường lỏng không chọn lọc: Cấy phần mẫu thử trong dung dịch đậm pepton ở nhiệt độ phòng, sau đó ủ ở 37°C trong 18 ± 2h.
- Tăng sinh trong môi trường lỏng chọn lọc : Cấy dịch tăng sinh chọn lọc thu được vào môi trường Rappaport-Vassiliadis với đậu tương (môi trường RVS) và môi trường Tetrathionat/novobioxin muller-kauffmann (môi trường MKTTn)  
Môi trường RVS được ủ ở 41,5°C ± 1°C trong 24h ± 3h và môi trường MKTTn được ủ ở 37 °C ± 1°C trong 24h ± 3h.
- Đổ đĩa và nhận dạng: Cấy dịch tăng sinh thu được vào môi trường đặc chọn lọc - Thạch Deoxycholat Lyzin Xyloza (thạch XLD). Ủ ở 37°C ± 1°C và được kiểm tra sau 24h ± 3h.
- Kháng định để nhận dạng: Chọn những khuẩn lạc *Salmonella* giả định được kháng định để nhận dạng chúng bằng các phép thử sinh hóa và huyết thanh thích hợp.

### **IV. An toàn Phòng thử nghiệm**

Các phương pháp an toàn phòng thí nghiệm cần được thực hiện nghiêm ngặt như sử dụng áo blouse, găng tay, khẩu trang... khi cần thiết

Không ăn uống trong phòng thí nghiệm.

Các môi trường sau khi nuôi cấy phải được hấp tiệt trùng trước khi thải.

<p style="text-align: center;"><b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b></p>	<p>Mã số: <b>HD.VS.0005</b>  Lần ban hành: 02  Ngày ban hành: <b>01/03/2017</b>  Trang: 3/14</p>
---	---	--

## **V. Bảo quản mẫu**

Số lượng vi sinh vật trong mẫu tăng rất nhanh trong điều kiện nhiệt độ phòng, dẫn đến cho kết quả không chính xác so với thực tế.

Để khắc phục ảnh hưởng này, nên thực hiện phân tích mẫu càng sớm càng tốt.

Nếu không phân tích được ngay thì phải bảo quản mẫu:

- sản phẩm không dễ phân hủy: nhiệt độ môi trường (từ 18 °C đến 27 °C);
- sản phẩm đông lạnh và đông lạnh sâu: dưới - 15 °C, tốt nhất là dưới -18 °C;
- các sản phẩm khác dễ phân hủy ở nhiệt độ môi trường, kể cả thực phẩm bị hỏng: từ 3 °C ± 2 °C

Và phải được phân tích mẫu không quá 24h.

Tham khảo TCVN 6404:2016, TCVN 6507-2 đến TCVN 6507-5

## **B. PHÂN TÍCH**

### **I. Thiết bị và dụng cụ**

- a. Cân kỹ thuật
- b. Tủ ấm, có khả năng ủ ở 37°C± 1°C và 41.5°C± 1°C
- c. Nồi hấp autoclave
- d. Nồi cách thủy: có thể hoạt động từ 44°C đến 47°C
- e. Máy dập mẫu Stomacher
- f. Thiết bị đếm khuẩn lạc
- g. Máy đo pH
- h. Đĩa petri
- i. Pipet 1ml.
- j. Que cấy vòng.
- k. Ống nghiệm, bình hoặc chai có dung tích thích hợp và không lớn hơn 500ml

### **II. Hóa chất và dung dịch hóa chất**

a. Môi trường tăng sinh sơ bộ không chọn lọc: Dung dịch đậm pepton => Ghi chép vào “BM.VS.002.06”

Pepton từ casein

10.0g

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.0005</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: <b>01//03/2017</b> Trang:4/14
--	----------------------------	---

Natri Clorua	5.0g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	9.0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	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  $7.0 \pm 0.2$  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): => Ghi chép vào **“BM.VS.002.06”**

=> Dung dịch A:

Pepton từ đậu tương	5.0g
Natri Clorua	8.0g
Kali dihydro phosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.4g
Dikali hydro phosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	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 <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	400.0g
Nước	1000ml

Hòa tan MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 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

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.0005</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: <b>01/03/2017</b> Trang: 5/14
--	----------------------------	---

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.

- 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. Chính pH sao cho khử trùng là  $5.2 \pm 0.2$ , nếu cần. Phân phối các lượng 10ml vào các ống nghiệm trước khi sử dụng. Khử trùng  $115^{\circ}\text{C}$  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) => Ghi chép vào **“BM.VS.002.06”**

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  $44^{\circ}\text{C}$  đến  $47^{\circ}\text{C}$

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 đổ đĩa đặc chọn lọc :

**Thạch Deoxycolat Lyzin Xyloza (thạch XLD)** => Ghi chép vào **“BM.VS.002.06”**

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.

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.0005</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: <b>01/03/2017</b> Trang: 6/14
--	----------------------------	---

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

**Thạch Hektoen Enteric Agar (thạch HE) => Ghi chép vào “BM.VS.002.06”**

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

e. Thạch dinh dưỡng: => Ghi chép vào “BM.VS.002.06”

Cao thịt	3.0g
Pepton	5.0g
Thạch	15g
Nước	1000ml

Hòa tan hỗn hợp trên trong nước, đun nóng nếu cần.

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

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

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.

f. Thạch TSI: => Ghi chép vào “BM.VS.002.06”

Cao thịt	3.0g
Cao nấm men	3.0g
Pepton	20.0g
Natri Clorua	5.0g
Lactose	10.0g
Sucrose	10.0g

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.0005</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: <b>01//03/2017</b> Trang: 7/14
--	----------------------------	--

Glucose	1.0g
Sắt (III) xitrat	0.3g
Natri thiosulphat	0.3g
Phenol đỏ	0.024g
Thạch	15g
Nước	1000ml

Hòa tan hỗn hợp trên trong nước, đun nóng nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là  $7.0 \pm 0.2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , nếu cần

Phân phối 10ml môi trường vào các ống nghiệm

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

Đặt nghiêng để thạch có bề dày trên đáy từ 2,5cm đến 5cm.

g. Thạch Urê => Ghi chép vào “**BM.VS.002.06**”

\* Môi trường cơ bản:

Pepton	1.0g
Glucoza	1.0g
Natri Clorua (NaCl)	5.0g
Kali dihydro phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2.0g
Phenol đỏ	0.012g
Thạch	9g – 18g
Nước	1000ml

$\text{pH} = 6.8 \pm 0.2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$

Hòa tan, khử trùng  $121^{\circ}\text{C}/15$  phút

\* Dung dịch urê

Urê	400g
Nước vừa đủ	1000ml

Hòa tan urê trong nước. Lọc để khử trùng và kiểm tra độ vô trùng

\* Môi trường hoàn chỉnh:

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.0005</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: <b>01//03/2017</b> Trang:8/14
--	----------------------------	---

Môi trường cơ bản                      950ml

Dung dịch urê                              50ml

Ở điều kiện vô trùng, cho dung dịch urê vào môi trường cơ bản đã làm tan chảy trước và sau đó để nguội đến nhiệt độ từ 44°C – 47°C. Phân phối 10ml môi trường hoàn chỉnh vào ống nghiệm. Đặt nghiêng.

h. Môi trường L-Lyzin đã khử nhóm cacboxyl: => Ghi chép vào **“BM.VS.002.06”**

L-Lyzin monohydroclorua              5.0g

Cao nấm men                              3.0g

Glucoza                                      1.0g

Bromocrezol đỏ tía                      0.015g

Nước                                         1000ml

Hòa tan hỗn hợp trên trong nước, đun nóng nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là  $6.8 \pm 0.2$  ở 25°C, nếu cần

Phân phối 2ml đến 5ml môi trường vào các ống nghiệm. Đậy nắp ống nghiệm

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

i. Phát hiện  $\beta$  –galactosidaza => Ghi chép vào **“BM.VS.002.06”**

\* Dung dịch muối sinh lý

Natri Clorua (NaCl)                      8.5g

Nước                                         1000ml

\* Toluene

\* Thuốc thử  $\beta$ -galactosidaza

- Dung dịch đệm

Kali dihydro phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )              6.9g

Natri hydroxit (10mol/l)                      khoảng 3ml

Nước vừa đủ                                 50ml

Hòa tan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  trong khoảng 45ml nước đựng trong bình định mức

Dùng dung dịch NaOH để chỉnh pH đến  $7.0 \pm 0.2$  ở 25°C



<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.0005</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: <b>01/03/2017</b> Trang: 9/14
--	----------------------------	---

Thêm nước vừa đủ 50ml

- Dung dịch ONPG:

O-Nitrophenyl - D-β- galactopyranosit (ONPG)	0.08g
Nước	15ml

Hòa tan ONPG trong nước ở khoảng 50°C. Làm nguội dung dịch.

- Thuốc thử hoàn chỉnh:

Dung dịch đậm	5ml
Dung dịch ONPG	15ml

j. Môi trường phản ứng Voges-Proskauer (VP) => Ghi chép vào **“BM.VS.002.06”**

\* Môi trường VP:

Pepton	7.0g
Glucosa	5.0g
Dinatri hydro phosphate ( $K_2HPO_4$ )	5.0g
Nước	1000ml

pH =  $6.9 \pm 0.2$  ở 25°C

Hòa tan các thành phần. Cho 3ml môi trường vào ống nghiệm. Hấp 121°C/15 phút

\* Dung dịch creatin (N-amindinosarcosin)

Creatin ngâm 1 phân tử nước	0.5g
Nước	100ml

\* Dung dịch 1-Naphthol trong cồn:

1-Naphtol	6g
Etanol, 96%	100ml

\* Dung dịch Kali hydroxit

Kali hydroxit	40g
Nước	100ml

k. Môi trường phản ứng Indol: => Ghi chép vào **“BM.VS.002.06”**

\* Môi trường trypton broth:

<p><b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b></p>	<p><b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b></p>	<p>Mã số: <b>HD.VS.0005</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: <b>01//03/2017</b> Trang:10/14</p>
---	-----------------------------------	--

Cân 15g môi trường trong 1000ml nước chưng cất ( theo nhà sản xuất). Hòa tan bằng cách đun sôi. Phân phối 5ml môi trường vào ống nghiệm. Hấp 121°C/15phút

\* Thuốc thử Kovacs

4-Dimetylaminobenzaldehyt	5g
Axit clohydric, $\rho = 1.18\text{g/ml}$ đến $1.19\text{ g/ml}$	25ml
2-Metylbutan-2-ol	75ml

l. Huyết thanh:

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

### **III. 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

### **IV. 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 đậm pepton đã được khử trùng.

Đối với mẫu Cacao và các sản phẩm có chứa cacao (ví dụ nhiều hơn 20%) : Thêm dung dịch đậm 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 đậm pepton.

Bromocresol tím có màu thay đổi từ vàng thành tím với vùng chuyển màu là pH 5,2 – 6,8

Ủ ở  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  trong  $18\text{h} \pm 2\text{h}$

#### **2. Tăng sinh chọn lọc:**

<p><b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b></p>	<p><b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b></p>	<p>Mã số: <b>HD.VS.0005</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: <b>01//03/2017</b> Trang: 11/14</p>
---	-----------------------------------	---

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  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  trong  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ , và môi trường MKTTn đã cấy dịch tăng sinh ở  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  trong  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ .

### 3. Cấy lên đĩa chọn lọc:

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: (Ghi nhận vào biểu mẫu theo dõi kết quả *Salmonella* “**BM.VS.005.01**”)

=> 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  $\text{H}_2\text{S}$  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. Khẳng định: (Ghi nhận vào biểu mẫu theo dõi kết quả *Salmonella* “**BM.VS.005.01**”)

a. Chọn khuẩn lạc để khẳng định:

Để khẳng 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 ria 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  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ .

b. Khẳng định sinh hóa:

- Thạch TSI: Cấy ria 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)

<p><b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b></p>	<p><b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b></p>	<p>Mã số: <b>HD.VS.0005</b>  Lần ban hành: 02  Ngày ban hành: <b>01//03/2017</b>  Trang:12/14</p>
---	-----------------------------------	---

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:

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  $\beta$ -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  $37^{\circ}\text{C}$  trong 5 phút. Thêm 0.25ml thuốc thử  $\beta$ -galactosidaza và lắc đều. Đặt lại ống vào nồi cách thủy để ở  $37^{\circ}\text{C}$  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.

<p><b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b></p>	<p><b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b></p>	<p>Mã số: <b>HD.VS.0005</b>  Lần ban hành: 02  Ngày ban hành: <b>01//03/2017</b>  Trang:13/14</p>
---	-----------------------------------	---

**5. Khẳng định huyết thanh:** (Ghi nhận vào biểu mẫu theo dõi kết quả *Salmonella* “**BM.VS.005.01**”)

a. Loại trừ chủng tự ngưng kết:

Cho một giọt dung dịch muối lên phiến kính thủy tinh đã được làm sạch một cách cẩn thận. Dùng que cấy vòng trộn đều dung dịch với khuẩn lạc cần thử, để thu được huyền phù đục và đồng nhất. Lắc nhẹ phiến kính từ 30 giây đến 60 giây. Quan sát kết quả trên nền tối, tốt nhất dùng kính lúp. Nếu vi khuẩn ít nhiều có kết dính các đơn vị lại với nhau, thì chủng này được xem là tự ngưng kết, và sẽ không phải thử nghiệm tiếp vì không thể phát hiện kháng nguyên được.

b. Kiểm tra kháng nguyên O:

Sử dụng một khuẩn lạc thuần khiết không có khả năng tự ngưng kết, tiến hành giống như trên, sử dụng một giọt huyết thanh kháng nguyên O thay cho dung dịch muối.

Nếu xuất hiện ngưng kết, thì phản ứng được xem là dương tính.

c. Kiểm tra kháng nguyên Vi:

Tiến hành giống như trên, sử dụng một giọt huyết thanh kháng nguyên O thay cho dung dịch muối.

Nếu xuất hiện ngưng kết, thì phản ứng được xem là dương tính.

d. Kiểm tra kháng nguyên H:

Tiến hành giống như trên, sử dụng một giọt huyết thanh kháng nguyên O thay cho dung dịch muối.

Nếu xuất hiện ngưng kết, thì phản ứng được xem là dương tính.

**6. Đọc kết quả test sinh hóa:**

- Thạch TSI: Các khuẩn lạc *Salmonella* điển hình: lactose và sucrose âm tính (màu đỏ trên bề mặt nghiêng của thạch); glucose dương tính và sinh khí hydrosulfua (màu vàng khi cấy đâm sâu và thạch bị đen)

*Salmonella* dương tính với lactose được phân lập, thì trên bề mặt nghiêng của thạch TSI có màu vàng.

- Thạch urê: *Salmonella* không phân giải urê.
- Môi trường L-Lyzin đã khử nhóm cacboxyl: *Salmonella* cho phản ứng dương tính
- Phản ứng  $\beta$ -galactosidaza: *Salmonella* cho phản ứng âm tính.
- Phản ứng VP: *Salmonella* cho phản ứng âm tính

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.0005</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: <b>01/03/2017</b> Trang: 14/14
--	----------------------------	--

- Phản ứng Indol: *Salmonella* cho phản ứng âm tính.

### **C. TÍNH KẾT QUẢ**

#### **1. Giải thích phản ứng sinh hóa và huyết thanh:**

<b>Phản ứng sinh hóa</b>	<b>Tự ngưng kết</b>	<b>Phản ứng huyết thanh</b>	<b>Giải thích</b>
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>

#### **2. 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.

### **D. BẢO ĐẢM KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM**

Sử dụng chứng dương *Salmonella typhi* ATCC 14028 cho khuẩn lạc điển hình và tương ứng với bảng test sinh hóa và huyết thanh.

Mẫu blank phải cho kết quả âm tính

### **E. BÁO CÁO KẾT QUẢ**

Ghi kết quả vào **BM.VS.005.01**

Báo cáo kết quả vào **BM.015.06**