

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13370:2021

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG CHUỖI THỰC PHẨM –
PHÁT HIỆN NHANH *SALMONELLA* SPP.
SỬ DỤNG THẠCH IRIS *SALMONELLA***

*Microbiology of the food chain –
Rapid detection of Salmonella spp. using IRIS Salmonella agar*

HÀ NỘI – 2021

Lời nói đầu

TCVN 13370:2021 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.

Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phát hiện nhanh *Salmonella* spp. sử dụng thạch IRIS *Salmonella*

Microbiology of the food chain –

Rapid detection of Salmonella spp. using IRIS Salmonella agar

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện nhanh *Salmonella* spp. sử dụng thạch IRIS *Salmonella*[®].

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho:

- các sản phẩm thực phẩm và thức ăn chăn nuôi;
- các mẫu môi trường, ngoại trừ mẫu lấy từ giai đoạn sản xuất ban đầu.

Phương pháp này có thể phát hiện các loài và các serovar điển hình và không điển hình như *S. enterica* serovar Typhimurium, *S. enterica* serovar Paratyphi, các *Salmonella* dương tính với lactose (*S. enterica* serovar Senftenberg và các phân loài *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*), các chủng *Salmonella* dương tính với sacarose, các serovar không di động (*S. enterica* serovar Pullorum và *S. enterica* serovar Gallinarum), các chủng một pha, các chủng có hoạt độ esterase thấp hoặc không có hoạt độ esterase trên các môi trường khác (*Salmonella bongori*, *S. enterica* serovar Dublin, *S. enterica* serovar Atento và một số chủng của các phân loài *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*).

CHÚ THÍCH: Thạch IRIS *Salmonella*[®] cũng có thể được sử dụng làm môi trường phân lập thứ hai trong phương pháp chuẩn [TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017)] để phát hiện *Salmonella*.

Phụ lục A cung cấp thông tin về các kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp và phép thử liên phòng thử nghiệm.

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 6404:2016 (ISO 7218:2007 with Amendment 1:2013) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật*

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

TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017) *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp phát hiện, định lượng và xác định typ huyết thanh của Salmonella – Phần 1: Phương pháp phát hiện Salmonella spp.*

ISO 16140-6 *Microbiology of the food chain – Method validation – Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures (Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Xác nhận giá trị sử dụng phương pháp – Phần 6: Quy trình xác nhận giá trị sử dụng phương pháp thay thế (độc quyền) đối với việc khẳng định định kiểu vi sinh vật)*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Salmonella (*Salmonella*)

Các vi sinh vật hình thành các khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc ít điển hình trên môi trường chọn lọc và có các đặc điểm về sinh hoá và huyết thanh được mô tả khi tiến hành các thử nghiệm theo tiêu chuẩn này.

3.2

Phát hiện Salmonella (detection of *Salmonella*)

Việc xác định *Salmonella* trong một khối lượng hoặc thể tích cụ thể của sản phẩm hoặc diện tích bề mặt hoặc vật thể khi tiến hành các thử nghiệm theo tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Tăng sinh

Sử dụng môi trường tăng sinh *Salmonella* (5.1), pha loãng mẫu thử với tỷ lệ 1/10 (hoặc 1/4 trong một số trường hợp) trong canh thang tăng sinh *Salmonella*.

Sau đó, thêm chất bổ sung IRIS *Salmonella*[®] hoặc chất bổ sung CSD vào canh thang và hỗn hợp mẫu thử và ủ trong khoảng thời gian từ 16 h đến 24 h ở nhiệt độ 41,5 °C ± 1 °C.

4.2 Phân lập

Tiến hành phân lập bằng cách ria cấy canh thang đã tăng sinh lên thạch IRIS *Salmonella*[®] (5.7) và ủ trong thời gian 24 h ± 3 h ở nhiệt độ 37 °C ± 1 °C. Việc sử dụng thạch IRIS *Salmonella*[®] dựa trên việc phát hiện hoạt độ esterase C8 của *Salmonella*.

4.3 Nhận diện khuẩn lạc

Khuẩn lạc *Salmonella* có màu cánh sen (hồng sẫm), trong khi khuẩn lạc của các loài khác có màu xanh, màu tím hoặc không màu.

Các chất ức chế chọn lọc sẽ ức chế các vi khuẩn Gram dương và một số vi khuẩn Gram âm.

4.4 Kháng định

Bước kháng định cuối cùng có thể được thực hiện bằng các phép thử nêu trong phương pháp chuẩn hoặc phương pháp đã được xác nhận giá trị sử dụng, trực tiếp từ một khuẩn lạc nghi ngờ có màu hồng sẫm phân lập từ thạch IRIS *Salmonella*[®].

5 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích, nước sử dụng là nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

5.1 Môi trường tăng sinh *Salmonella*¹⁾

5.1.1 Thành phần

Pepton	10,00 g
Natri clorua	5,00 g
Đệm phosphat	5,06 g
Nước vừa đủ	1 L

Bảo quản thành phần môi trường khô ở nhiệt độ từ 2 °C đến 30 °C.

¹⁾ Sử dụng sản phẩm của Biokar-diagnostics, 60002 Beauvais Cedex, Pháp. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

TCVN 13370:2021

5.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan 20,06 g các thành phần vào 1 L nước. Trộn đều cho đến khi môi trường tan hoàn toàn. Phân phối vào các ống nghiệm hoặc lọ nhỏ (6.4) sao cho huyền phù gốc có thể pha loãng đến tỷ lệ 1/10 hoặc 1/4. Tiệt trùng bằng nồi hấp áp lực (6.3) ở nhiệt độ 121 °C trong thời gian 15 min. Để thạch nguội đến nhiệt độ phòng.

pH của môi trường sử dụng ngay là $7,0 \pm 0,2$ ở 25 °C.

CHÚ THÍCH 1: Thành phần môi trường có thể được điều chỉnh để có hiệu năng tối ưu.

CHÚ THÍCH 2: Thành phần của môi trường tăng sinh *Salmonella* phù hợp với môi trường nước đệm pepton.

Bảo quản môi trường đã chuẩn bị ở nhiệt độ từ 2 °C đến 25 °C.

5.2 Môi trường tăng sinh *Salmonella* hai lần đệm ²⁾

5.2.1 Thành phần

Pepton	10,00 g
Natri clorua	5,00 g
Đệm phosphat	10,12 g
Nước vừa đủ	1 L

Bảo quản thành phần môi trường khô ở nhiệt độ từ 2 °C đến 30 °C.

5.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan 25,12 g các thành phần vào 1 L nước. Trộn đều cho đến khi môi trường tan hoàn toàn. Phân phối vào các ống nghiệm hoặc lọ nhỏ (6.4) sao cho huyền phù gốc có thể pha loãng đến tỷ lệ 1/10 hoặc 1/4. Tiệt trùng bằng nồi hấp áp lực (6.3) ở nhiệt độ 121 °C trong thời gian 15 min. Để thạch nguội đến nhiệt độ phòng.

pH của môi trường sử dụng ngay là $7,0 \pm 0,2$ ở 25 °C.

Bảo quản môi trường đã chuẩn bị ở nhiệt độ từ 2 °C đến 25 °C.

5.3 Môi trường tăng sinh *Salmonella* bổ sung Tween ²⁾

Môi trường tăng sinh *Salmonella* (5.1) bổ sung Tween® 80 [polyoxyetylen (20) sorbitan monooleat] nồng độ 10 g/L.

²⁾ Sử dụng sản phẩm của Biokar-diagnostics, 60002 Beauvais Cedex, Pháp. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

5.4 Chất bổ sung IRIS *Salmonella*[®] dạng viên³⁾, chứa natri sulfadiazine (hàm lượng từ 1 % đến 20 %) và novobiocine (hàm lượng từ 0,1 % đến 1 %), bao gồm loại sử dụng cho 225 mL canh thang và loại sử dụng cho 90 mL canh thang.

5.5 Chất bổ sung IRIS *Salmonella*[®] dạng lỏng³⁾, chứa natri sulfadiazine (hàm lượng > 0,1 %) và novobiocine (hàm lượng > 0,1 %), đựng trong lọ (vial) dung tích 50 mL.

5.6 Chất bổ sung CSD³⁾, dạng lỏng đựng trong lọ dung tích 100 mL hoặc dạng viên tương ứng với 10 g và 25 g phần mẫu thử.

5.7 Thạch IRIS *Salmonella*[®]³⁾

5.7.1 Thành phần

Pepton	10,0 g
Chất chiết nấm men	5,0 g
Natri clorua	5,0 g
Đệm phosphat	7,0 g
Các chất ức chế chọn lọc	10,2 g
Hỗn hợp màu	1,0 g
Thạch dùng cho vi sinh vật	16,0 g
Chất hỗ trợ quan sát vi khuẩn	6,5 g
Nước vừa đủ	1 L

Bảo quản thành phần môi trường khô ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

5.7.2 Chuẩn bị

Hòa tan 60,7 g các thành phần vào 1 L nước. Đun sôi từ từ, khuấy liên tục cho môi trường tan hoàn toàn. Duy trì đun sôi 2 min. Không để quá nhiệt. Không hấp khử trùng. Để thạch nguội đến nhiệt độ phòng và rót vào các đĩa Petri (6.7). Đặt đĩa thạch đông đặc trên bề mặt phẳng, trong môi trường mát.

pH của môi trường sử dụng ngay là $7,0 \pm 0,2$ ở 25 °C.

Bảo quản môi trường đã chuẩn bị ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

³⁾ Sử dụng sản phẩm của Biokar-diagnostics, 60002 Beauvais Cedex, Pháp.

5.7.3 Thử nghiệm hiệu năng đảm bảo chất lượng môi trường nuôi cấy

Các kết quả điển hình sau ủ 24 h ở nhiệt độ 37 °C trên thạch IRIS *Salmonella*®:

Chủng <i>Salmonella</i> Typhimurium WDCM 00031:	Sinh trưởng tốt, khuẩn lạc màu hồng sẫm
Chủng <i>Salmonella</i> Enteritidis WDCM 00030:	Sinh trưởng tốt, khuẩn lạc màu hồng sẫm
Chủng <i>Enterobacter aerogenes</i> WDCM 00175:	Sinh trưởng tốt, khuẩn lạc màu xanh
Chủng <i>Escherichia coli</i> WDCM 00013:	Ít bị ức chế, khuẩn lạc không màu
Chủng <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00034:	Bị ức chế
Chủng <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00025:	Bị ức chế

5.8 α -Amylase.

5.9 Chất trung hòa.

6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh thông thường và các thiết bị, dụng cụ sau đây:

6.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

6.2 Dụng cụ đo pH, có độ chính xác đến 0,1 đơn vị pH ở 25 °C.

6.3 Nồi hấp áp lực, có thể kiểm soát ở nhiệt độ 121 °C.

6.4 Ống nghiệm hoặc lọ nhỏ (vial).

6.5 Bình định mức, dung tích 1 L.

6.6 Máy trộn nhu động.

6.7 Đĩa Petri vô trùng, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo, đường kính 90 mm.

6.8 Pipet xả hết, vô trùng, dung tích danh nghĩa 1 mL, được chia vạch 0,1 mL.

6.9 Micropipet, có thể phân phối các thể tích thích hợp.

6.10 Tủ lạnh, có thể duy trì được nhiệt độ ở 2 °C đến 8 °C.

6.11 Tủ ấm, có thể duy trì được nhiệt độ ở 37 °C \pm 1 °C và 41,5 °C \pm 1 °C.

6.12 Que cấy vòng vô trùng, đường kính khoảng 3 mm (dung tích 10 μ l) và **kim cấy** hoặc **que cấy**.

7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này.

Mẫu phòng thử nghiệm nhận được phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị phần mẫu thử theo phần tương ứng của bộ TCVN 6507 (ISO 6887).

9 Cách tiến hành

9.1 Mẫu thực phẩm, mẫu thức ăn chăn nuôi, mẫu môi trường

Bằng cách vô trùng, cho 1(x) g phần mẫu thử vào 9(x) mL môi trường tăng sinh *Salmonella* (5.1).

CHÚ THÍCH 1: Chuẩn bị huyền phù ban đầu trong môi trường tăng sinh bổ sung Tween (5.3) để tăng sinh đối với các nền mẫu chứa hàm lượng chất béo lớn hơn 20 %.

CHÚ THÍCH 2: Sử dụng môi trường tăng sinh hai lần đậm (5.2) hoặc môi trường tăng sinh *Salmonella* (5.1) đối với các nền mẫu axit hoặc nền mẫu axit hóa.

Thêm chất bổ sung IRIS *Salmonella*[®] dạng lỏng (5.5) hoặc chất bổ sung IRIS *Salmonella*[®] dạng viên (5.4). Nếu sử dụng chất bổ sung dạng lỏng, thêm vào với nồng độ 0,1 mL/g mẫu (ví dụ: thêm 2,5 mL vào 25 g phần mẫu thử). Nếu sử dụng chất bổ sung dạng viên, cho trực tiếp một viên chất bổ sung thích hợp tương ứng với 225 mL canh thang (đối với phần mẫu thử 25 g) hoặc với 90 mL canh thang (đối với phần mẫu thử 10 g).

CHÚ THÍCH 3: Các mẫu bề mặt sau khi rửa (mẫu môi trường) có thể chứa các chất khử trùng, nên sử dụng 10 % chất trung hòa (5.9) và 90 % môi trường tăng sinh *Salmonella* sau đó thêm chất bổ sung CSD (5.6) dạng lỏng (nồng độ 0,1 mL/g phần mẫu thử) hoặc dạng viên (một viên, loại tương ứng với 10 g hoặc 25 g phần mẫu thử). Có thể sử dụng gạc, bọt biển hoặc miếng vải ngâm trong dung dịch trung hòa.

Trộn đều, sử dụng máy trộn nhu động (6.6) nếu cần.

Ủ canh thang trong tủ ấm (6.11) ở nhiệt độ $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, thời gian ủ từ 16 h đến 24 h.

Dùng que cấy vòng vô trùng (6.12), lấy 10 μL dịch môi trường tăng sinh và ria cấy lên bề mặt đĩa thạch IRIS *Salmonella*[®] (5.7).

Ủ đĩa thạch ở nhiệt độ $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong thời gian $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

9.2 Mẫu bột ngũ cốc và sản phẩm từ bột ngũ cốc

Bằng cách vô trùng, cho 1(x) g phần mẫu thử vào 9(x) mL môi trường tăng sinh *Salmonella* (5.1) đã được làm ấm đến nhiệt độ 41,5 °C.

CHÚ THÍCH: Thêm amylase (5.8) với nồng độ 0,1 g/L đối với các mẫu sản phẩm ngũ cốc dành cho trẻ nhỏ.

Thêm chất bổ sung IRIS *Salmonella*[®] dạng lỏng (5.5) với nồng độ 0,1 mL/g mẫu (ví dụ: thêm 12,5 mL vào 125 g phần mẫu thử).

Trộn đều, sử dụng máy trộn nhu động (6.6) nếu cần.

Ủ canh thang trong tủ ấm (6.11) ở nhiệt độ 41,5 °C ± 1,0 °C, thời gian ủ từ 18 h đến 24 h.

Dùng que cấy vòng vô trùng (6.12), lấy 10 µL dịch môi trường tăng sinh và ria cấy lên bề mặt đĩa thạch IRIS *Salmonella*[®] (5.7).

Ủ đĩa thạch ở nhiệt độ 37 °C ± 1 °C trong thời gian 24 h ± 3 h.

9.3 Mẫu sữa bột

Bằng cách vô trùng, cho 1(x) g phần mẫu thử vào 9(x) mL môi trường tăng sinh *Salmonella* (5.1) đã được làm ấm đến nhiệt độ 41,5 °C.

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng môi trường tăng sinh hai lần đậm (5.2) đối với các nền mẫu axit hoặc nền mẫu axit hóa.

Thêm chất bổ sung IRIS *Salmonella*[®] dạng lỏng (5.5) với nồng độ 0,1 mL/g mẫu (ví dụ: thêm 37,5 mL vào 375 g phần mẫu thử).

Trộn đều, sử dụng máy trộn nhu động (6.6) nếu cần.

Ủ canh thang trong tủ ấm (6.11) ở nhiệt độ 41,5 °C ± 1,0 °C, thời gian ủ từ 18 h đến 24 h.

Dùng que cấy vòng vô trùng (6.12), lấy 10 µL dịch môi trường tăng sinh và ria cấy lên bề mặt đĩa thạch IRIS *Salmonella*[®] (5.7).

Ủ đĩa thạch ở nhiệt độ 37 °C ± 1 °C trong thời gian 24 h ± 3 h.

9.4 Mẫu thức ăn công thức dạng bột dành cho trẻ sơ sinh, có hoặc không có probiotic

9.4.1 Mẫu có khối lượng dưới 50 g

Bằng cách vô trùng, cho 1(x) g phần mẫu thử vào 9(x) mL môi trường tăng sinh *Salmonella* (5.1).

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng môi trường tăng sinh hai lần đậm (5.2) hoặc môi trường tăng sinh *Salmonella* (5.1) đối với các nền mẫu chứa probiotic.

Thêm chất bổ sung IRIS *Salmonella*[®] (5.4 hoặc 5.5) hoặc chất bổ sung CSD (5.6), dạng lỏng hoặc dạng viên. Nếu sử dụng chất bổ sung dạng lỏng, thêm vào với nồng độ 0,1 mL/g mẫu (ví dụ: thêm 2,5 mL vào 25 g phần mẫu thử). Nếu sử dụng chất bổ sung dạng viên, cho trực tiếp một viên chất bổ sung thích hợp tương ứng với phần mẫu thử 25 g hoặc với phần mẫu thử 10 g; đối với phần mẫu thử lớn hơn 25 g, có thể dùng kết hợp một số viên chất bổ sung (ví dụ: dùng 3 viên chất bổ sung loại 25 g cho 75 g phần mẫu thử).

Trộn đều, sử dụng máy trộn nhu động (6.6) nếu cần.

Ủ canh thang trong tủ ấm (6.11) ở nhiệt độ $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, thời gian ủ từ 16 h đến 24 h nếu sử dụng chất bổ sung IRIS *Salmonella*[®] và từ 16 h đến 22 h nếu sử dụng chất bổ sung CSD.

Dùng que cấy vòng vô trùng (6.12), lấy 10 μL dịch môi trường tăng sinh và ria cấy lên bề mặt đĩa thạch IRIS *Salmonella*[®] (5.7).

Ủ đĩa thạch ở nhiệt độ $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 24 h \pm 3 h.

9.4.2 Mẫu có khối lượng từ 50 g đến 375 g

Bằng cách vô trùng, cho 1(x) g phần mẫu thử vào 3(x) mL môi trường tăng sinh *Salmonella* (5.1) đã được làm ấm đến nhiệt độ $41,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

CHÚ THÍCH 1: Có thể sử dụng môi trường tăng sinh hai lần đậm (5.2) hoặc môi trường tăng sinh *Salmonella* (5.1) đối với các nền mẫu chứa probiotic.

Thêm chất bổ sung CSD dạng lỏng (5.6) với nồng độ 0,1 mL/g mẫu (ví dụ: thêm 37,5 mL vào 375 g phần mẫu thử). Nếu sử dụng chất bổ sung dạng viên, có thể dùng kết hợp một số viên chất bổ sung.

CHÚ THÍCH 2: Có thể tiến hành theo quy trình pha loãng 1/10 [cho 1(x) g phần mẫu thử vào 9(x) mL môi trường tăng sinh] và sử dụng chất bổ sung IRIS *Salmonella*[®].

Trộn đều, sử dụng máy trộn nhu động (6.6) nếu cần.

Ủ canh thang trong tủ ấm (6.11) ở nhiệt độ $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, thời gian ủ từ 18 h đến 24 h.

Dùng que cấy vòng vô trùng (6.12), lấy 10 μL dịch môi trường tăng sinh và ria cấy lên bề mặt đĩa thạch IRIS *Salmonella*[®] (5.7).

Ủ đĩa thạch ở nhiệt độ $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 24 h \pm 3 h.

9.5 Lưu ý

Canh thang sau khi ủ (xem 9.1 đến 9.4) có thể giữ đến 3 ngày ở nhiệt độ từ $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ trước khi chuyển sang thạch IRIS *Salmonella*.

Thạch IRIS *Salmonella* sau khi ủ có thể giữ đến 3 ngày ở nhiệt độ từ $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ trước khi đọc kết quả (xem Điều 10) và tiến hành bước khẳng định (xem Điều 11).

10 Đọc kết quả

Hình thái các khuẩn lạc trên thạch IRIS *Salmonella*[®] bao gồm:

- | | |
|---|---|
| + <i>Salmonella</i> spp.: | Khuẩn lạc đặc trưng có màu từ hồng đến hồng sẫm |
| + <i>Escherichia coli</i> : | Khuẩn lạc đặc trưng không màu |
| + <i>Enterobacter</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp.: | Khuẩn lạc đặc trưng màu từ lục lam đến tím |
| + <i>Proteus</i> spp.: | Khuẩn lạc đặc trưng từ không màu đến màu nâu nhạt |
| + Các vi khuẩn Gram dương: | Bị ức chế. |

11 Khẳng định

Các kết quả dương tính giả định đều phải được khẳng định bởi một trong các phương pháp sau:

- phương pháp chuẩn [TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017)] (bao gồm cả bước tinh sạch), bắt đầu từ khuẩn lạc màu hồng sẫm được phân lập trên môi trường IRIS *Salmonella*.
- các phương pháp khác đã được xác nhận giá trị sử dụng hoặc đã được chuẩn hóa theo ISO 16140-6 (ví dụ: phép thử *Salmonella* Latex), sử dụng các khuẩn lạc đặc trưng được phân lập trên môi trường IRIS *Salmonella*.

Trong trường hợp có kết quả không đồng nhất (dương tính giả định với phương pháp thay thế, nhưng không khẳng định được bởi một trong các phương pháp nêu trên), phòng thử nghiệm phải thực hiện các bước cần thiết để đảm bảo tính hợp lệ của kết quả. Ví dụ: có thể tiến hành các phép thử sinh hóa hoặc đo đoạn dò nucleic theo TCVN 6404 (ISO 7218).

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin dưới đây:

- mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- các điểm đặc biệt quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được cho là tùy chọn, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được (dương tính hoặc âm tính) và đơn vị biểu thị kết quả.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Mẫu thịt bò xay được cấy chủng *Salmonella* Typhimurium A00C060. Các mức cấy chủng như sau:

- + Mức 0 cfu/25 mL
- + Mức từ 1 đến 10 cfu/25 mL
- + Mức từ 5 đến 50 cfu/25 mL

Mười bảy phòng thử nghiệm tham gia phép thử liên phòng. Mỗi phòng thử nghiệm nhận được 48 mẫu, gồm 24 mẫu tiến hành theo phương pháp chuẩn [TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017)] và 24 mẫu tiến hành theo phương pháp thay thế nêu trong tiêu chuẩn này. Ngoài ra, có một mẫu định lượng tổng vi sinh vật hiếu khí ưa ấm trong mẫu không cấy chủng theo TCVN 4884 (ISO 4833).

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu tương đối và độ chụm do NF Validation (thuộc Viện Tiêu chuẩn Pháp) thực hiện năm 2019 được nêu trong các Bảng A.1 và A.2.

a) Độ chính xác, độ nhạy và độ đặc hiệu tương đối

Độ chính xác là mức độ gần nhau giữa kết quả thử nghiệm và giá trị tham chiếu được chấp nhận.

Độ đặc hiệu tương đối là mức độ mà một phương pháp chịu hoặc không chịu ảnh hưởng bởi các thành phần không phải là thành phần đích trong mẫu nhiều thành phần. Độ đặc hiệu tương đối thể hiện khả năng của phương pháp để đo hoặc định lượng chính xác một chất phân tích nhất định trong mẫu thử mà không bị nhiễu bởi các thành phần không phải là thành phần đích, ví dụ: ảnh hưởng của nền mẫu hoặc nhiễu nền.

Độ nhạy tương đối là khả năng của phương pháp thay thế để phát hiện hai lượng chất phân tích khác nhau được đo trước đó bằng phương pháp chuẩn, sử dụng một chất nền nhất định, trên toàn bộ dải đo. Sự thay đổi về số lượng tối thiểu (sự gia tăng nồng độ x của chất phân tích) tạo ra sự thay đổi đáng kể trong tín hiệu đo được (đáp ứng y).

Bảng A.1 – So sánh độ chính xác, độ nhạy và độ đặc hiệu

Thông số	Nghiên cứu liên phòng	Nghiên cứu so sánh phương pháp	
		Cấy BPWW bổ sung 16 h ở 41,5 °C	Nuôi cấy 24 h ở 41,5 °C
Độ chính xác tương đối (AC), %	99,7	89,7	90,0
Độ nhạy (SE), %	100,0	87,4	88,0
Độ đặc hiệu (SP), %	100,0	91,6	91,0

b) Độ chụm (độ lặp lại và độ tái lập)

Độ lặp lại trong phân tích định tính là phần trăm cơ hội thu được cùng một kết quả (tức là đều dương tính hoặc đều âm tính) với hai mẫu giống hệt nhau được phân tích bởi cùng một phòng thử nghiệm, trong các điều kiện lặp lại (nghĩa là bởi một người thực hiện sử dụng cùng một dụng cụ và thuốc thử, trong phạm vi thời gian cách nhau ngắn nhất đến mức có thể).

Độ tái lập trong phân tích định tính là phần trăm cơ hội thu được cùng một kết quả đối với hai mẫu giống hệt nhau được phân tích bởi hai phòng thử nghiệm khác nhau.

Bảng A.2 – So sánh độ lặp lại và độ tái lập

Mức cấy chủng	Độ lặp lại, %		Độ tái lập, %	
	Phương pháp chuẩn [TCVN 10780-1 (ISO 6579-1)]	Phương pháp sử dụng thạch IRIS <i>Salmonella</i>	Phương pháp chuẩn [TCVN 10780-1 (ISO 6579-1)]	Phương pháp sử dụng thạch IRIS <i>Salmonella</i>
Mức 0	97,8	100,0	98,3	100,0
Mức 1	100,0	100,0	100,0	100,0
Mức 2	100,0	100,0	100,0	100,0

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] NF Validation (2015), *IRIS Salmonella method for the detection of Salmonella*
 - [2] Solabia SAS (2021), *IRIS Salmonella – Detection method for Salmonellae*, Technical Data Sheet, Env8-2021
 - [3] AOAC 967.27 *Salmonella in foods. Identification*
 - [4] AOAC 978.24 *Salmonella spp. in foods. Biochemical identification kit method*
 - [5] AOAC 989.12 *Salmonella spp., Escherichia coli, and other Enterobacteriaceae in foods. Biochemical identification kit method*
 - [6] AOAC 991.13 *Salmonella, Escherichia coli, and other Enterobacteriaceae in foods. Biochemical system identification (Vitek GNI+) screening method*
 - [7] AOAC 2011.17 *Salmonella, Escherichia coil, and other Enterobacteriaceae. VITEK 2 Gram-negative (GN) biochemical identification method*
 - [8] TCVN 4884 (ISO 4833) *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm - Phương pháp định lượng vi sinh vật*
 - [9] TCVN 12365-2:2018 (ISO 16140-2:2016) *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Xác nhận giá trị sử dụng phương pháp – Phần 2: Quy trình xác nhận giá trị sử dụng phương pháp thay thế so với phương pháp chuẩn*
-