

TCVN 7927:2008

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG
STAPHYLOCOCCUS AUREUS BẰNG
PHƯƠNG PHÁP TÍNH SỐ CÓ XÁC SUẤT LỚN NHẤT**

*Foodstuffs – Detection and enumeration of staphylococcus aureus
by most probable number (MPN) method*

Lời nói đầu

TCVN 7927:2008 được xây dựng trên cơ sở AOAC 987.09 *Staphylococcus aureus in Foods. Most Probable Number Method for Isolation and Enumeration*;

TCVN 7927:2008 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 đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm – Phát hiện và định lượng *Staphylococcus aureus* bằng phương pháp tính số có xác suất lớn nhất

Foodstuffs – Detection and enumeration of staphylococcus aureus

by most probable number (MPN) method

CẢNH BÁO — Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể cần phải sử dụng các vật liệu, thiết bị và các thao tác nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đề cập đến các vấn đề an toàn khi sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn qui định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp phát hiện và định lượng *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) với số lượng nhỏ trong thực phẩm và trong các thành phần của thực phẩm dự đoán có chứa một lượng lớn các loài cạnh tranh bằng kỹ thuật tính số có xác suất lớn nhất (MPN).

2 Thuốc thử và môi trường nuôi cấy

2.1 Yêu cầu chung

Các thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích và nước được sử dụng phải là nước cất hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có qui định khác.

2.2 Canh thang trypticaza (tryptic) đậu tương chứa 10 % natri clorua (NaCl) và 1 % natri pyruvat

Cho 95 g NaCl vào 1000 ml dung dịch của 17,0 g trypticaza hoặc tryptozin (sản phẩm thủy phân tuyến tụy của casein), 3,0 g phyton (sản phẩm thủy phân papain của bột đậu tương), 5,0 g NaCl, 2,5 g K₂HPO₄, 2,5 g dextroza (trypticaza khan hoặc canh thang tryptin đậu tương là thích hợp) và 10 g natri

pyruvat. Chỉnh pH đến 7,3. Đun nóng nhẹ, nếu cần. Phân phối các lượng 10 ml vào các ống nghiệm kích thước 16 mm x 150 mm. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. Độ pH cuối cùng phải là $7,3 \pm 0,2$. Dung dịch này có thể bảo quản được đến 1 tháng ở nhiệt độ $4\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

2.3 Dung dịch muối sinh lý

Hoà tan 8,5 g NaCl trong 1000 ml nước. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C và để nguội đến nhiệt độ phòng.

2.4 Môi trường Baird-Parker (thạch trứng tellurit glyxin pyruvat)

2.4.1 Môi trường cơ bản

Hoà tan 10,0 g trypton, 5,0 g dịch chiết thịt bò, 1,0 g dịch chiết nấm men, 10,0 g natri pyruvat, 12,0 g glyxin, 5,0 g $\text{LiCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ và 20,0 g thạch trong 950 ml H_2O . Đun nóng đến sôi, thỉnh thoảng khuấy để hoà tan hết các thành phần. Phân phối các lượng 95 ml vào các chai có nắp vặn. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. Độ pH cuối cùng phải là $7,0 \pm 0,2$ ở 25 °C. Dung dịch này có thể bảo quản được đến 1 tháng ở nhiệt độ $4\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

2.4.2 Môi trường tăng sinh

Ngâm các quả trứng tươi khoảng 1 min trong dung dịch HgCl_2 bão hoà đã pha loãng (1 + 1000). Làm vỡ các quả trứng một cách vô trùng, tách riêng lòng trắng và lòng đỏ. Trộn lòng đỏ với dung dịch muối sinh lý (2.3) theo tỷ lệ (3 + 7, tính theo thể tích), dùng bộ trộn tốc độ cao để trộn trong khoảng 5 s. Cho vào 50 ml nhũ tương lòng đỏ trứng 10 ml dung dịch kali tellurit 1 % đã lọc để khử trùng (khối lượng trên thể tích). Trộn đều và bảo quản ở nhiệt độ $4\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

2.4.3 Môi trường hoàn chỉnh

Cho 5 ml môi trường tăng sinh (2.4.2) vào 95 ml môi trường cơ bản (2.4.1) đã được làm ấm đến nhiệt độ từ 45 °C đến 50 °C. Trộn kỹ, tránh tạo bọt và rót các lượng từ 15 ml đến 18 ml vào các đĩa petri vô trùng có kích thước 100 mm x 15 mm. Bảo quản các đĩa này ở nhiệt độ phòng (25 °C) đến 5 ngày trước khi sử dụng. Môi trường này phải mở đục đều; không sử dụng các đĩa không mở đục. Làm khô các đĩa trước khi sử dụng theo một trong các phương pháp sau đây:

- mở nắp đĩa, úp bề mặt thạch xuống, đặt vào tủ thông gió hoặc tủ ẩm 30 min ở 50 °C;
- đậy nắp đĩa và đặt vào tủ không khí cưỡng bức hoặc tủ ẩm trong 2 h ở 50 °C;
- đậy nắp đĩa và đặt vào tủ ẩm 4 h ở 35 °C, hoặc
- đậy nắp đĩa và để trên bàn của phòng thử nghiệm từ 16 h đến 18 h ở nhiệt độ phòng.

2.4.4 Canh thang tim-não (BHI)

Hoà tan dịch chiết từ khoảng 200 g não bê và 250 g tim bò, 10,0 g pepton proteoza hoặc Gelysat, 5,0 g NaCl, 2,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ và 2,0 g glucoza trong 1000 ml nước, đun nóng nhẹ, nếu cần. Phân phối các lượng 5 ml vào các ống nghiệm có kích thước 16 mm x 150 mm và hấp áp lực 15 min ở 121 °C. Độ pH cuối cùng phải là $7,4 \pm 0,2$.

2.4.5 Huyết tương coagulaza khô (thỏ) với EDTA

Hoàn nguyên theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Nếu không sẵn có, thì hoàn nguyên huyết tương coagulaza khô (thỏ) và thêm $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ để có được nồng độ cuối cùng là 0,1 % trong huyết tương đã hoàn nguyên.

2.4.6 Dịch pha loãng phosphat đậm Butterfield

2.4.6.1 Dung dịch gốc

Hoà tan 34,0 g KH_2PO_4 trong 500 ml nước, dùng khoảng 175 ml dung dịch NaOH 1 M để chỉnh pH đến 7,2 và pha loãng đến 1000 ml. Bảo quản trong tủ lạnh.

2.4.6.2 Dịch pha loãng

Pha loãng 1,25 ml dung dịch gốc đến 1000 ml bằng nước. Dùng dung dịch này để chuẩn bị các dung dịch trắng, phân phối các lượng đủ, có tính đến hao hụt trong khi hấp áp lực. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C.

3 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

3.1 Pipet, dung tích 1,0 ml, 5,0 ml và 10,0 ml được chia vạch tương ứng là 0,1 ml, 0,5 ml và 1,0 ml.

3.2 Bộ trộn, vận hành với tốc độ cao từ 16 000 r/min đến 18 000 r/min, có trang bị các bình trộn bằng kim loại hoặc bằng thủy tinh 1000 ml, có nắp đậy. Một bình được dùng cho mỗi đơn vị phân tích.

3.3 Máy trộn, Vortex Genie hoặc loại tương đương.

3.4 Nồi cách thủy, duy trì được ở nhiệt độ từ 35 °C đến 37 °C.

3.5 Tủ ấm, duy trì được ở nhiệt độ từ 35 °C đến 37 °C.

4 Cách tiến hành

4.1 Chuẩn bị mẫu thử

Cân một cách vô trùng khoảng 50 g mẫu thử chưa rã đông cho vào bình trộn vô trùng. Thêm 450 ml dịch pha loãng đệm phosphat và đồng hoá trong 2 min ở tốc độ cao (từ 16 000 r/min đến 18 000 r/min). Sử dụng dịch pha loãng 1:10 này để chuẩn bị các dãy dịch pha loãng từ 10^{-2} đến 10^{-6} bằng cách chuyển 10 ml dịch pha loãng 1:10 vào 90 ml dịch pha loãng trắng, lắc mạnh để trộn kỹ và tiếp tục cho đến khi thu được dịch pha loãng 10^{-6} .

4.2 Kỹ thuật tính số có xác suất lớn nhất

Cấy vào 3 ống đựng canh thang trypticaza đậu tương với NaCl 10 % và natri pyruvat 1 % (2.2) ở mỗi độ pha loãng với các lượng 1 ml của dịch pha loãng thập phân. Cần có đủ độ pha loãng từ phần mẫu thử để có được điểm kết thúc âm tính. Ủ ấm trong 48 h ở 35 °C.

Sử dụng vòng cấy 3 mm, chuyển 1 vòng cấy đầy từ mỗi ống phát triển dương tính sang các đĩa đựng môi trường Baird-Parker khô (2.4). Trộn các ống trên máy trộn Vortex trước khi ria cấy nếu chỉ thấy mọc ở trên đáy hoặc bên thành ống. Ria cấy sao cho thu được các khuẩn lạc mọc tách biệt. Ủ 48 h ở 35 °C đến 37 °C.

4.3 Khẳng định

Đối với mỗi ống cho thấy có sự phát triển, lấy 1 hoặc nhiều hơn các khuẩn lạc nghi ngờ là *S. aureus*. Dùng kim cấy vô trùng chuyển các khuẩn lạc sang các ống chứa 0,2 ml canh thang BHI (2.4.4) và các mặt nghiêng của thạch chứa môi trường duy trì thích hợp bất kỳ, ví dụ như thạch trypticaza đậu tương thạch đếm đĩa chuẩn, v.v... Giữ lại các chủng cấy trên ống thạch ở nhiệt độ phòng để dự phòng, hoặc lặp lại phép thử trong trường hợp các kết quả thu được có nghi ngờ.

Cho 0,5 ml huyết tương coagulaza có EDTA (2.4.5) hoàn nguyên vào dịch cấy BHI và trộn kỹ. Ủ ấm ở nhiệt độ từ 35 °C đến 37 °C và cứ sau 6 h kiểm tra sự kết đông. Bất kỳ sự kết đông nào cũng được coi là phản ứng dương tính. Các cục kết đông nhỏ hoặc thưa có thể quan sát được bằng cách gõ nhẹ ống sao cho phần chất lỏng của hỗn hợp phản ứng chạm tới miệng ống, các cục đông sẽ nhô lộ ra phía trên bề mặt chất lỏng. Các chủng dương tính coagulaza được coi là *S. aureus*. Các phép kiểm chứng âm tính và dương tính phải được thực hiện đồng thời với các chủng cấy của khả năng phản ứng coagulaza chưa biết. Kiểm tra lại các kết quả thử nghiệm coagulaza nghi ngờ trên các chủng cấy BHI đã được ủ ấm ở 35 °C đến 37 °C từ 18 h đến 48 h.

4.4 Diễn giải kết quả

Các khuẩn lạc của *S. aureus* điển hình tròn, trơn nhẵn, lồi, ướt, có đường kính từ 2 mm đến 3 mm trên các đĩa mọc thưa, có màu đen xám đến đen nhánh, thường có viền sáng màu (không trắng), có quang đục bao quanh (kết tủa) và thường có vùng trong phía ngoài; các khuẩn lạc dính khi tiếp xúc với kim cấy. Đôi khi có thể gặp phải các chủng không phân giải lipit có vẻ bề ngoài tương tự, ngoại trừ không có quang đục bao quanh và các vùng sáng. Các khuẩn lạc được phân lập từ các loại thực phẩm khô hoặc đông lạnh đã được bảo quản trong khoảng thời gian dài thường ít đen hơn các khuẩn lạc điển hình và có thể có dạng bên ngoài thô nhám và cấu trúc khô.

5 Biểu thị kết quả

Tính số có xác suất lớn nhất (MPN) của *S. aureus* trên gam sản phẩm từ Bảng 1.

Bảng 1 – Các số có xác suất lớn nhất (MPN) trên gam phần mẫu thử, sử dụng 3 ống có các phần mẫu thử tương ứng là 0,1 g, 0,01 g và 0,001 g

Các ống dương tính				Các ống dương tính				Các ống dương tính				Các ống dương tính			
0,1	0,01	0,001	MPN	0,1	0,01	0,001	MPN	0,1	0,01	0,001	MPN	0,1	0,01	0,001	MPN
0	0	0	<3	1	0	0	3,6	2	0	0	9,1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7,2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2 ^a	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3 ^a	9	1	0	3 ^a	15	2	0	3 ^a	26	3	0	3 ^a	95
0	1	0	3	1	1	0	7,3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6,1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2 ^a	9,2	1	1	2 ^a	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3 ^a	12	1	1	3 ^a	19	2	1	3 ^a	34	3	1	3	160
0	2	0	6,2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1 ^a	9,3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2 ^a	12	1	2	2 ^a	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3 ^a	16	1	2	3 ^a	24	2	2	3 ^a	42	3	2	3	290
0	3	0	9,4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1 ^a	13	1	3	1 ^a	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2 ^a	16	1	3	2 ^a	24	2	3	2 ^a	44	3	3	2	1100
0	3	3 ^a	19	1	3	3 ^a	29	2	3	3 ^a	53	3	3	3	>1100

^a Các kết quả không chắc chắn cao như thế muốn nói rằng có mặt các yếu tố làm ảnh hưởng đến độ thu hồi hoặc nhận dạng đối với các dịch pha loãng thấp hơn. Do đó, giá trị MPN có thể thấp hơn nhiều so với nồng độ thực.

6 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
 - phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
 - phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
 - mọi chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
 - các kết quả thử nghiệm thu được.
-