TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 7715-2 : 2007
ISO 10272-2 : 2006

Xuất bản lần 1

VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI – PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG *CAMPYLOBACTER* SPP.– PHẦN 2: KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. – Part 2: Colony-count technique

HÀ NỘI – 2007

Lời nói đầu

TCVN 7715-2 : 2007 hoàn toàn tương đương với ISO 10272-2 : 2006;

TCVN 7715-2 : 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 7715 : 2007 Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng *Campylobacte*r spp., bao gồm:

- Phần 1: Phương pháp phát hiện;
- Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc.

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 hoà 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 vậy 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.

Xuất bản lần 1

Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng *Campylobacter* spp. – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp.–

Part 2: Colony-count technique

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này mô tả phương pháp định lượng *Campylobacter* spp.

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho các sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi và cho các mẫu môi trường trong khu vực sản xuất và chế biến thực phẩm 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) (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 6404 (ISO 7218), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn chăn nuôi – Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật

TCVN 6263 (ISO 8261), Sữa và sản phẩm sữa. Hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh

ISO/TS 11133–1, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory* (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị

và tạo môi trường cấy – Phần 1: Các hướng dẫn chung về đảm bảo chất lượng cho việc chuẩn bị môi trường cấy trong phòng thử nghiệm)

ISO/TS 11133–2 : 2003, *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* (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và tạo môi trường cấy – Phần 2: Các hướng dẫn thực hành về thử tính năng của môi trường cấy).

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Campylobacter (Campylobacter)

Các vi sinh vật hình thành các khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường đặc chọn lọc khi được nuôi cấy trong môi trường vi hiếu khí ở 41,5 °C mà không phải ở 25 °C, có tính di động và các đặc tính sinh hóa và phát triển điển hình khi thử nghiệm theo tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Các loài thường hay gặp nhất là *Campylobacter jejuni* và *Campylobacter coli.* Tuy nhiên, các loài khác cũng đã được mô tả (*Campylobacter lari, Campylobacter upsaliensis* và một số loài khác).

3.2

Đếm *Campylobacter* (count of *Campylobacter*)

Số lượng *Campylobacter* tìm thấy trong một mililit hoặc một gam mẫu thử, khi tiến hành thử theo phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Chuẩn bị các dung dịch pha loãng

Để chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân từ mẫu thử, xem TCVN 6507 (ISO 6887) và TCVN 6263 (ISO 8261).

4.2 Định lượng

Ủ môi trường đặc chọn lọc, thạch deoxycolat xefoperazon than cải biến (mCCD) và một lượng xác định của mẫu thử nếu sản phẩm ban đầu là dạng lỏng, hoặc một lượng xác định của huyền phù ban đầu nếu sản phẩm ở dạng khác.

Chuẩn bị các đĩa môi trường khác trong cùng một điều kiện, dùng các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu.

Ủ các đĩa này ở 41,5 ^{0}C trong môi trường vi hiếu khí trong 40 giờ đến 48 giờ.

Các khuẩn lạc nghi ngờ là *Campylobacter* được cấy truyền lên môi trường thạch không chọn lọc, thạch huyết Columbia, rồi khẳng định bằng cách kiểm tra dưới kính hiển vi và bằng các phép thử sinh hóa và phát triển thích hợp.

Số lượng *Campylobacter* có trong một mililit hoặc trong một gam mẫu thử được tính từ số khuẩn lạc điển hình đã được khẳng định trên một đĩa.

5 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

5.1 Khái quát

Về thực hành thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 (ISO 7218), ISO/TS 11133-1 và ISO/TS 11133-2.

5.2 Dịch pha loãng

Xem TCVN 6507 (ISO 6887).

5.3 Thạch deoxycolat xefoperazon than cải biến (thạch mCCD)

5.3.1 Môi trường cơ bản

5.3.1.1 Thành phần

Cao thịt	10,0 g
Dịch thuỷ phân mô động vật bằng enzym	10,0 g
Natri clorua	5,0 g
Than	4,0 g
Dịch thuỷ phân casein bằng enzym	3,0 g
Natri deoxycolat	1,0 g
Sắt (II) sulfat	0,25 g
Natri pyruvat	0,25 g
Thạch	8,0 g đến 18,0 g [a]
Nước	1 000 ml

[a] Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

5.3.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần cơ bản hoặc môi trường cơ bản hoàn chỉnh khô trong nước, bằng cách đun đến sôi. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là 7,4 $\pm$ 0,2 ở 25 ^{0}C, nếu cần. Phân phối môi trường cơ bản vào bình cầu có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121 ^{0}C.

5.3.2 Dung dịch kháng sinh

5.3.2.1 Thành phần

Xefoperazon	0,032 g
Amphoterixin B	0,01 g
Nước	5 ml

5.3.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước. Lọc để khử trùng.

5.3.3 Môi trường hoàn chỉnh

5.3.3.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.3.1)	1 000 ml
Dung dịch kháng sinh (5.3.2)	5 ml

5.3.3.2 Chuẩn bị

Cho dung dịch kháng sinh vào môi trường cơ bản, đã làm nguội đến 47 °C ± 2 °C, trộn đều. Rót khoảng 15 ml môi trường hoàn chỉnh vào các đĩa Petri vô trùng (6.8). Để cho đông đặc. Ngay trước khi sử dụng, làm khô cẩn thận các đĩa thạch, tốt nhất là mở nắp và để mặt thạch úp xuống phía dưới, để vào tủ sấy (6.2) trong 30 min hoặc cho đến khi bề mặt thạch khô. Nếu đã chuẩn bị trước thì các đĩa thạch chưa khô không để quá 4 h ở nhiệt độ phòng, hoặc nếu bảo quản ở nơi tối với nhiệt độ 5 °C ± 3 °C thì không quá 7 ngày.

5.3.3.3 Kiểm tra tính năng

Đối với việc xác định tính chọn lọc và hiệu quả, xem ISO/TS 11133-1. Đối với các tiêu chí thực hiện, xem Bảng B.5 của ISO/TS 11133-2 : 2003.

5.4 Thạch huyết Columbia

5.4.1 Môi trường cơ bản

5.4.1.1 Thành phần

Dịch thuỷ phân mô động vật bằng enzym	23,0 g
Tinh bột	1,0 g
Natri clorua	5,0 g
Thạch	8,0 g đến 18,0 g [a]
Nước	1 000 ml

[a] Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

5.4.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần cơ bản hoặc môi trường cơ bản hoàn chỉnh khô trong nước, bằng cách đun đến sôi. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là 7,3 ± 0,2 ở 25 ^{0}C, nếu cần. Phân phối môi trường cơ bản vào bình cầu có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121 ^{0}C.

5.4.2 Huyết cừu vô trùng đã khử fibrin

5.4.3 Môi trường hoàn chỉnh

5.4.3.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.4.1)	1 000 ml
Huyết cừu vô trùng đã khử fibrin (5.4.2)	50 ml

5.4.3.2 Chuẩn bị

Cho huyết cừu một cách vô trùng vào môi trường cơ bản, đã làm nguội đến 47 °C ± 2 °C, trộn đều. Rót khoảng 15 ml môi trường hoàn chỉnh vào các đĩa Petri vô trùng (6.8). Để cho đông đặc. Ngay trước khi sử dụng, làm khô cẩn thận các đĩa thạch, tốt nhất là mở nắp và để mặt thạch úp xuống phía dưới, để vào tủ sấy (6.2) trong 30 min hoặc cho đến khi bề mặt thạch khô. Nếu đã chuẩn bị trước thì các đĩa thạch chưa khô không để quá 4 h ở nhiệt độ phòng, hoặc nếu bảo quản ở nơi tối với nhiệt độ 5 °C ± 3 °C thì không quá 7 ngày.

5.4.3.3 Kiểm tra tính năng

Để xác định tính chọn lọc và hiệu suất, xem ISO/TS 11133-1.

Để kiểm tra tính năng, xem ISO/TS 11133-2. Các chủng kiểm chứng *C.coli* ATCC 43478 hoặc *C.jejuni* ATCC 33291 phải cho thấy mọc tốt trên thạch huyết Columbia sau khi ủ vi hiếu khí trong 24 h ở 37 °C.

5.5 Canh thang Brucella

5.5.1 Thành phần

Dịch thuỷ phân casein bằng enzym	10,0 g
Dịch thuỷ phân mô động vật bằng enzym	10,0 g
Glucoza	1,0 g
Cao men	2,0 g
Natri clorua	5,0 g
Natri hydrosulfit	0,1 g
Nước	1 000 ml

5.5.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần cơ bản hoặc môi trường cơ bản hoàn chỉnh khô trong nước, bằng cách đun nóng, nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là 7,0 ± 0,2 ở 25 ^{0}C, nếu cần. Phân phối môi trường cơ bản này với các lượng 10 ml vào các ống nghiệm có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121 ^{0}C.

5.5.3 Kiểm tra tính năng

Đối với việc xác định tính chọn lọc và hiệu suất, xem ISO/TS 11133-1. Đối với các tiêu chí thực hiện, xem Bảng B.4 của ISO/TS 11133-2 : 2003.

5.6 Thuốc thử phát hiện oxidaza

5.6.1 Thành phần

N,N,N',N'-Tetrametyl-1,4-phenylenediamin dihydro clorua	1,0 g
Nước	100 ml

5.6.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trên vào nước ngay trước khi sử dụng.

6 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ 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 **để khử trùng ướt (nồi hấp áp lực)**

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.2 Tủ sấy được đối lưu không khí hoặc **tủ ấm,** có khả năng hoạt động ở nhiệt độ từ 37 ^{0}C đến 55 ^{0}C.

6.3 Tủ ấm, có khả năng hoạt động ở 41,5 ^{0}C ± 1 ^{0}C.

6.4 Tủ ấm, có khả năng hoạt động ở 25 ^{0}C ± 1 ^{0}C.

6.5 Nồi cách thủy, có khả năng hoạt động ở nhiệt độ từ 44 ^{0}C đến 47 ^{0}C.

6.6 Máy đo pH, có độ chính xác đến 0,1 đơn vị pH ở 25 ^{0}C.

6.7 Dụng cụ chứa, ví dụ như các chai, ống nghiệm, bình cầu thích hợp cho việc khử trùng và bảo quản dịch pha loãng và môi trường cấy.

6.8 Đĩa Petri, tốt nhất là bằng thuỷ tinh hoặc chất dẻo có khấc, đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

6.9 Pipet chia độ xả hết, dung tích danh định 1 ml và 10 ml được chia độ đến 0,1 ml, có lỗ xả rộng.

6.10 Núm cao su, hoặc bất kỳ hệ thống an toàn nào khác có thể phù hợp với pipet chia độ.

6.11 Que cấy vòng, bằng platin/iridi hoặc niken/crom hoặc bằng chất dẻo, đường kính khoảng 3 mm và **vòng cấy** cùng chất liệu, hoặc **đũa** thuỷ tinh hoặc chất dẻo.

CHÚ THÍCH: Vòng niken/crom không thích hợp để sử dụng trong phép thử oxidaza (xem 9.4.3).

6.12 Que dàn mẫu, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo.

6.13 Kính hiển vi, tốt nhất là loại có phản pha (để quan sát tính di động đặc trưng của *Campylobacter*).

6.14 Thiết bị thích hợp để đạt được môi trường vi hiếu khí, với hàm lượng oxi là 5 % ± 2 %, cacbon dioxit 10 % ± 3 %, hydro tùy chọn ≤ 10 %, có lượng nitơ cân bằng. Sử dụng các vật chứa kín khí để giữ đĩa Petri, ví dụ như các bình yếm khí. Môi trường vi hiếu khí khí thích hợp có thể thu được bằng cách sử dụng các bộ kit thử sinh khí có bán sẵn (tuân thủ hướng dẫn của nhà sản xuất một cách chính xác, đặc biệt là liên quan đến thể tích của bình và dung tích của kit thử sinh khí). Cách khác, xịt bình bằng hỗn hợp khí thích hợp trước khi ủ.

7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hay biến đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản. Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm. Nếu không có tiêu chuẩn riêng liên quan đến việc lấy mẫu sản phẩm thì các bên liên quan nên thoả thuận với nhau về vấn đề này.

Vì các loài *Campylobacter* spp. rất nhạy với việc đóng băng nhưng lại tồn tại rất tốt ở nhiệt độ thấp, nên các mẫu thử không được làm đông lạnh mà phải bảo quản ở + 3 ^{0}C ± 2 ^{0}C và nên phân tích càng nhanh càng tốt. Cần chú ý không làm mẫu khô.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo các tiêu chuẩn cụ thể thích hợp với sản phẩm có liên quan. Nếu không có các tiêu chuẩn cụ thể thì các bên có liên quan nên thoả thuận với nhau về vấn đề này.

9 Cách tiến hành

9.1 Phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng

Xem TCVN 6507 (ISO 6887) và tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm.

Chuẩn bị một dãy dung dịch pha loãng thập phân đơn lẻ từ mẫu thử nếu sản phẩm ở dạng lỏng hoặc từ huyền phù ban đầu nếu sản phẩm ở dạng khác.

9.2 Cấy và ủ

9.2.1 Dùng pipet vô trùng (6.9), chuyển vào hai đĩa đựng môi trường thạch mCCD (5.3), mỗi đĩa 0,1 ml huyền phù ban đầu (9.1). Dùng que dàn mẫu vô trùng (6.12) dàn cẩn thận dịch cấy càng nhanh càng tốt, không để chạm vào mép đĩa, cho đến khi không còn thấy dịch lỏng trên bề mặt thạch và đậy nắp đĩa.

Lặp lại thao tác này với các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo, nếu cần.

Đối với một số sản phẩm nhất định, khi cần phải định lượng một số lượng nhỏ *Campylobacter*, thì giới hạn định lượng có thể nhỏ đi 10 lần bằng cách kiểm tra 1,0 ml huyền phù ban đầu. Phân phối 1 ml dịch cấy lên môi trường thạch trên đĩa Petri to (140 mm) hoặc trên bề mặt môi trường thạch trong ba đĩa nhỏ (90 mm), sử dụng que dàn mẫu vô trùng (6.12). Trong cả hai trường hợp, chuẩn bị các bộ đĩa kép bằng cách dùng hai đĩa to hoặc sáu đĩa nhỏ.

9.2.2 Ủ các đĩa này (9.2.1) ở 41,5 ^{0}C từ 40 h đến 48 h trong môi trường vi hiếu khí (6.14).

9.3 Đếm và chọn khuẩn lạc để khẳng định

9.3.1 Trên thạch mCCD các khuẩn lạc điển hình có màu xám, thường có lấp lánh ánh kim loại, phẳng và ướt có xu hướng mọc lan tỏa. Các khuẩn lạc lan tỏa ít trên các bề mặt thạch khô. Có thể xuất hiện các khuẩn lạc có dạng khác.

Chọn các đĩa (9.2.2) chứa ít hơn 150 khuẩn lạc điển hình hoặc nghi ngờ và đếm các khuẩn lạc đó. Chọn ngẫu nhiên năm khuẩn lạc như thế và cấy truyền để thử khẳng định (9.4).

9.3.2 Cấy vạch từng khuẩn lạc đã chọn (9.3.1) lên đĩa thạch huyết Columbia (5.4) để cho phát triển thành các khuẩn lạc riêng biệt. Ủ các đĩa này trong môi trường vi hiếu khí ở 41,5 °C trong 24 h đến 48 h. Sử dụng các khuẩn lạc thuần khiết để kiểm tra hình thái, tính di động, mọc trong điều kiện vi hiếu khí ở 25 °C, mọc hiếu khí ở 41,5 °C và có mặt của oxidaza.

9.4 Khẳng định các loài *Campylobacter*

Vì vi khuẩn suy giảm chất lượng rất nhanh trong không khí, do đó các qui trình mô tả trong 9.4.1 đến 9.4.3 cần được thực hiện ngay.

9.4.1 Kiểm tra hình thái và tính di động

9.4.1.1 Hòa một khuẩn lạc từ đĩa thạch huyết Columbia (9.3.2) vào 1 ml canh thang Brucella (5.5) và sử dụng kính hiển vi (6.13) để kiểm tra về hình thái và tính di động.

9.4.1.2 Giữ tất cả các khuẩn lạc (9.3.2) được tìm thấy (9.4.1.1) để kiểm tra tiếp theo, trong đó các trực khuẩn uốn cong có di động xoáy “mở nút chai”.

9.4.2 Nghiên cứu sự phát triển ở 25 °C (vi hiếu khí) và 41,5 °C (hiếu khí)

Sử dụng một que cấy vòng (6.11) cấy các khuẩn lạc đã phân lập trong 9.4.1.2, lên bề mặt của hai đĩa thạch huyết Columbia (5.4).

Ủ một đĩa ở 25 °C trong môi trường vi hiếu khí (6.14) từ 40 h đến 48 h. Đĩa còn lại ủ trong môi trường hiếu khí ở 41,5 °C từ 40 h đến 48 h.

Kiểm tra các đĩa về sự phát triển của khuẩn lạc *Campylobacter* mà có thể nhìn thấy được.

9.4.3 Phát hiện oxidaza

Dùng vòng cấy hoặc que cấy bằng platin/iridi hoặc đũa thuỷ tinh (6.11), lấy một phần của mỗi khuẩn lạc được tách biệt rõ (9.4.1.2) và ria cấy lên giấy lọc đã được làm ẩm bằng thuốc thử oxidaza (5.6). Viền ngoài có màu tím hoa cà, màu tím hoặc màu xanh đậm trong 10 s chứng tỏ phản ứng dương tính. Nếu sử dụng kit thử oxidaza có bán sẵn thì tuân theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Khẳng định các kết quả sử dụng các kiểm chứng dương tính và âm tính. Các ví dụ về các chủng kiểm chứng thích hợp là *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662 (kiểm chứng dương tính), *Escherichia coli* NCTC 9001 (kiểm chứng âm tính).

9.4.4 Diễn giải kết quả

Campylobacter spp. cho các kết quả như trong Bảng 1.

Bảng 1 – Các đặc trưng của *Campylobacter* spp.

Hình thái học (9.4.1)	trực khuẩn uốn cong nhỏ
Tính di động (9.4.1)	đặc trưng
Mọc trong môi trường vi hiếu khí ở 25 °C (9.4.2)	–
Mọc trong môi trường hiếu khí ở 41,5 °C (9.4.2)	–
Oxidaza (9.4.3)	+

10 Biểu thị kết quả

10.1 Đếm các khuẩn lạc *Campylobacter*

10.1.1 Nếu ít nhất 80 % các khuẩn lạc được chọn đã được khẳng định (9.4.4), thì số lượng *Campylobacter* là số đếm được như trong 9.3.

10.1.2 Trong tất cả các trường hợp khác, tính số lượng *Campylobacter* thu được như trong 9.3 được khẳng định (9.4.4). Làm tròn kết quả đến số nguyên.

10.2 Phương pháp tính

10.2.1 Trường hợp chung – Các đĩa chứa từ 15 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc *Campylobacter* giả định

Số lượng *N* của *Campylobacter* có mặt trong mẫu thử là số trung bình của hai độ pha loãng liên tiếp, sử dụng công thức (1):

$$N = \frac{\sum a}{V \times \left[n_1 + (0{,}1 \times n_2)\right] \times d} \qquad (1)$$

trong đó:

$\sum a$ là tổng các khuẩn lạc phù hợp với các tiêu chí nhận dạng, đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại từ hai độ pha loãng liên tiếp và trong đó ít nhất một đĩa có chứa tối thiểu 15 khuẩn lạc.

V là thể tích dịch cấy trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;

n_1 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ nhất;

n_2 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ hai;

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất được giữ lại [d = 1 khi sản phẩm ở dạng lỏng (mẫu thử) không pha loãng].

Làm tròn số các kết quả thu được đến hai chữ số có nghĩa. Để làm tròn, nếu chữ số thứ ba nhỏ hơn 5 thì không thay đổi chữ số đứng trước nó; nếu chữ số thứ ba lớn hơn hoặc bằng 5 thì tăng chữ số đứng trước lên một đơn vị.

Lấy kết quả là số thích hợp giữa 1,0 và 9,9 nhân với lũy thừa tương ứng của 10, hoặc làm tròn số với hai chữ số có nghĩa.

Biểu thị kết quả như sau:

Số *N* ước tính của *Campylobacter* có trong một mililit (sản phẩm ở dạng lỏng) hoặc một gam (sản phẩm ở dạng khác).

VÍ DỤ: Số đếm có được các kết quả như sau:

- ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) được giữ lại: 66 khuẩn lạc và 80 khuẩn lạc;
- ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) được giữ lại: 4 khuẩn lạc và 7 khuẩn lạc.

Đã thực hiện kiểm tra các khuẩn lạc chọn lọc:

- đối với 66 khuẩn lạc: 4 trong 5 khuẩn lạc phù hợp với các tiêu chí, cho *a* = 66 (xem 10.1.1)
- đối với 80 khuẩn lạc: 3 trong 5 khuẩn lạc phù hợp với các tiêu chí, cho *a* = 48
- đối với 7 khuẩn lạc: 4 trong 5 khuẩn lạc phù hợp với các tiêu chí, cho *a* = 7
- đối với 4 khuẩn lạc: tất cả 4 khuẩn lạc đều được khẳng định.

$$\mathrm{N} = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0{,}1n_2)d} = \frac{66 + 48 + 7 + 4}{0{,}1 \times [2 + (0{,}1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{125}{2{,}2 \times 10^{-3}} = 56818$$

Làm tròn kết quả, số *Campylobacter* có trong một mililit hoặc một gam sản phẩm là 570 00 hoặc 5,7 x 10^4.

10.2.2 Trường hợp có hai đĩa chứa ít hơn 15 khuẩn lạc

Nếu hai đĩa mẫu thử (sản phẩm ở dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm ở dạng khác), hoặc từ độ pha loãng thứ nhất đã cấy hoặc được giữ lại, chứa ít hơn 15 khuẩn lạc điển hình, thì tính số ước tính N_E của *Campylobacter* có mặt trong mẫu thử là giá trị trung bình số học, của các khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa, theo công thức (2):

$$N_E = \frac{\sum a}{V \times n \times d} \qquad (2)$$

trong đó:

$\sum a$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa;

V là thể tích dịch cấy đã cấy trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;

n là số đĩa được giữ lại (trong trường hợp này n = 2);

d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu hoặc của độ pha loãng thứ nhất đã được cấy [d = 1 khi sản phẩm ở dạng lỏng (mẫu thử) không pha loãng].

Biểu thị kết quả như sau:

số lượng vi sinh vật ước tính là *N Campylobacter* trong một mililit (đối với sản phẩm ở dạng lỏng) hoặc trong một miligam (sản phẩm ở dạng khác).

VÍ DỤ: Số đếm có được từ các kết quả sau đây:

– ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-1}) được giữ lại: 12 khuẩn lạc và 13 khuẩn lạc đếm được:

$$N_E = \frac{12 + 13}{0{,}1 \times 2 \times 10^{-1}} = \frac{25}{0{,}02} = 1250$$

Làm tròn kết quả theo 10.2.1, số lượng vi sinh vật ước tính *N* của *Campylobacter* là 1300 hoặc 1,3 x 10^3 trong một mililit hoặc trong một gam sản phẩm.

10.2.3 Trường hợp có hai đĩa không chứa khuẩn lạc nào

Nếu hai đĩa của mẫu thử (sản phẩm ở dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm ở dạng khác) hoặc từ độ pha loãng thứ nhất đã cấy hoặc giữ lại không chứa khuẩn lạc nào, thì biểu thị kết quả như sau:

ít hơn 1/*d x V Campylobacter* trong một mililit (sản phẩm ở dạng lỏng) hoặc trong một gam (sản phẩm ở dạng khác);

trong đó:

d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu hoặc độ pha loãng thứ nhất đã cấy hoặc được giữ lại [$d = 10^0 = 1$ khi mẫu thử (dạng lỏng) đã cấy trực tiếp được giữ lại];

V là thể tích dịch cấy đã cấy lên các đĩa, tính bằng mililit.

10.2.4 Trường hợp đặc biệt

Các trường hợp đặc biệt được nêu trong TCVN 6404 (ISO 7218).

10.3 Độ chụm

Theo các lý do thống kê, trong 95 % các trường hợp thì các giới hạn tin cậy của kỹ thuật đếm khuẩn lạc dao động từ $\pm$ 16 % đến 52 % [3]. Đối với các số đếm khuẩn lạc nhỏ hơn 15 khuẩn lạc trên một đĩa, thì giới hạn tin cậy được đưa ra trong Phụ lục A. Trong thực tế, ngay cả khi dao động lớn hơn cũng có thể gặp phải, đặc biệt là các kết quả thu được từ nhiều người khác nhau thực hiện.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;

b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;

c) phương pháp thử và nhiệt độ ủ đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;

d) mọi chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy lựa chọn, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;

e) các kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A

(Qui định)

Giới hạn tin cậy đối với việc ước tính số lượng nhỏ các khuẩn lạc

Các giới hạn tin cậy ở mức 95 % đối với việc ước tính số lượng nhỏ các khuẩn lạc, khi số khuẩn lạc được giữ lại nhỏ hơn 15, được nêu trong Bảng A.1.

Bảng A.1

Số lượng vi sinh vật	Giới hạn tin cậy ở mức 95 %	
	dưới	trên
1	<1	2
2	< 1	4
3	< 1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

Thư mục tài liệu tham khảo

[1] BOLTON, F.J. et al. A blood-free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces. *J. Clin. Microbiol.* **19**, 1984, pp. 169-171

[2] CORRY, J.E.L. et al. (eds). Handbook of culture media for food microbiology. *Progress in Industrial Microbiology*. Vol. 37, Elsevier, Amsterdam, 2003

[3] COWELL N.D. and MORISETTI M.D. *J. Sci. Fd. Agric.* **20**, 1969, p. 573

[4] HUNT, J.M. et al. *Campylobacter*. In: *Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual*, 8th edition, AOAC, Arlington VA, USA, 1998

[5] HUTCHINSON, D.N. and BOLTON, F.J. Improved blood-free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimen. *J. Clin. Pathol.* **37**, 1984, pp. 956-957