

**TCVN 7715-1 : 2007**

**ISO 10272-1 : 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 1: PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN**

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

*Part 1: Detection method*

**HÀ NỘI – 2007**



## Lời nói đầu

TCVN 7715-1 : 2007 hoàn toàn tương đương với ISO 10272-1 : 2006;

TCVN 7715-1 : 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 7715 : 2007 Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng *Campylobacter* 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 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.

# Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng *Campylobacter* spp. – Phần 1: Phương pháp phát hiện

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. – Part 1: Detection method*

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này mô tả phương pháp phát hiện *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).

## TCVN 7715-1 : 2007

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 khí được nuôi cấy trong môi trường vi hiếu khí ở 41,5 °C mà không phải ở 25 °C, có tính di động và có 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

##### **Phát hiện *Campylobacter*** (detection of *Campylobacter*)

Xác định sự có mặt hay không có mặt các vi sinh vật này trong một lượng sản phẩm cụ thể, khi tiến hành phép thử theo phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

### 4 Nguyên tắc

#### 4.1 Khái quát

Nhìn chung, việc phát hiện *Campylobacter* đòi hỏi các bước sau đây (xem Phụ lục A về sơ đồ qui trình)

#### 4.2 Tăng sinh trong môi trường lỏng chọn lọc

Phần mẫu thử được cấy vào môi trường tăng sinh lỏng (canh thang Bolton) và trộn đều.

Đem ủ ở 37 °C trong 4 h đến 6 h ở môi trường vi hiếu khí, rồi ủ tiếp ở 41,5 °C trong 44 h ± 4 h.

#### 4.3 Phân lập và chọn lọc để khẳng định

Cấy dịch cấy thu được trong 4.2 vào hai môi trường đặc chọn lọc:

- thạch deoxycholat xefoperazon than cải biến (thạch mCCD);
- bất kì môi trường đặc chọn lọc nào khác về nguyên tắc khác với thạch mCCD.

Sau đó chúng được ủ ở 41,5 °C trong môi trường vi hiếu khí và kiểm tra sau 44 h ± 4 h để phát hiện sự có mặt các khuẩn lạc *Campylobacter* giả định theo các đặc trưng của chúng.

#### 4.4 Kháng định

Các khuẩn lạc *Campylobacter* giả định được cấy truyền lên môi trường huyết Columbia không chọn lọc và kháng định bằng các phép kiểm tra kính hiển vi, phép thử sinh hóa và phát triển thích hợp. Tùy chọn, các loài *Campylobacter* được nhận dạng bằng các phép thử sinh hóa đặc trưng và các phép thử độ nhạy kháng sinh.

### 5 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

#### 5.1 Khái quát

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

CHÚ THÍCH: 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 lỏng: Canh thang Bolton

Xem B.1.

#### 5.3 Môi trường đồ đĩa chọn lọc: thạch deoxycholat xefoperazon than cải biến (thạch mCCD)

Xem B.2.

#### 5.4 Thuốc thử và môi trường nhận dạng và kháng định

##### 5.4.1 Thạch huyết Columbia

Xem B.3.

##### 5.4.2 Canh thang Brucella

Xem B.4.

##### 5.4.3 Thuốc thử phát hiện oxidaza

Xem B.5.

##### 5.4.4 Dung dịch hydro peroxit, 3 % (theo thể tích).

##### 5.4.5 Thuốc thử phát hiện thủy phân hipurat

Xem B.6.

##### 5.4.6 Thạch huyết Hinton Mueller

Xem B.7.

**5.4.7 Các đĩa axit nalidixic (30 µg) và xephalotin (30 µg)**

**5.4.8 Đĩa indoxyl axetat**

Xem B.8.

**6 Thiết bị và dụng cụ thủy 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 ẩm**, có khả năng hoạt động ở nhiệt độ từ 37 °C đến 55 °C.

**6.3 Tủ ẩm**, có khả năng hoạt động ở 41,5 °C ± 1 °C.

**6.4 Nồi cách thủy**, có khả năng duy trì nhiệt độ ở 25 °C ± 1 °C và 37 °C ± 1 °C, hoặc tủ ẩm có thể duy trì được nhiệt độ ở 25 °C ± 1 °C và 37 °C ± 1 °C.

**6.5 Nồi cách thủy**, có khả năng hoạt động ở nhiệt độ từ 47 °C đến 50 °C.

**6.6 Máy đo pH**, có độ chính xác đến 0,1 đơn vị pH ở 25 °C.

**6.7 Dụng cụ chứa**, đặc biệt là các ống nuôi cấy có kích thước 18 mm x 180 mm và 9 mm x 180 mm, các ống phân giải huyết có kích thước 13 mm x 75 mm, các bình và/hoặc chai có dung tích thích hợp và có nắp đậy bằng kim loại không độc.

**6.8 Đĩa Petri**, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo có 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 và pipet Pasteur.

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

Vòng niken/crom là không thích hợp để sử dụng trong phép thử oxidaza (xem 9.4.6).

**6.12 Kẹp** bằng thép không gỉ, nhẵn, đầu tròn.

**6.13 Kính hiển vi**, tốt nhất là 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 oxy là  $5\% \pm 2\%$ , cacbon dioxit  $10\% \pm 3\%$ , hydro  $\leq 10\%$ , với lượng nitơ cân bằng. Sử dụng các vật chứa kín khí để giữ đĩa Petri và/hoặc bình cầu hoặc chai dung tích 350 ml để đựng canh thang tăng sinh, ví dụ như bình yếm khí.

CHÚ THÍCH 1: Môi trường vi hiếu khí thích hợp có thể thu được bằng cách sử dụng các bộ kit 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 sinh khí. Cách khác, bình có thể được nạp đầy hỗn hợp khí trước khi ủ.

CHÚ THÍCH 2: Cách thay thế ủ trong môi trường vi hiếu khí, canh thang tăng sinh có thể được ủ trong chai đựng có nắp vặn hoặc trong bình cầu đựng canh thang tăng sinh, có khoảng trống phía trên nhỏ hơn 2 cm và có nắp đậy kín khí.

## 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. 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 thỏa thuận với nhau về vấn đề này.

Vì các loài *Campylobacter* spp. rất nhạy cảm với nhiệt độ âm nhưng lại tồn tại rất tốt ở nhiệt độ thấp, nên các mẫu thử không được làm đông lạnh mà bảo quản ở  $+3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  và nên phân tích càng nhanh càng tốt. 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 thỏa thuận với nhau về vấn đề này.

## 9 Cách tiến hành (xem sơ đồ trong Phụ lục A)

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

**9.1.1** Xem các phần thích hợp của TCVN 6507 (ISO 6887) hoặc TCVN 6263 (ISO 8261).

**9.1.2** Nhìn chung, để chuẩn bị huyền phù ban đầu, lấy một lượng  $x$  của phần mẫu thử (theo khối lượng hoặc theo thể tích) cho vào canh thang tăng sinh Bolton (5.2) với thể tích lớn gấp chín lần, sao cho thu được tỷ lệ phần mẫu thử/môi trường tăng sinh là 1:10 (khối lượng/thể tích hoặc thể tích/thể tích) và đồng hóa.

## **9.2 Tăng sinh**

Ủ huyền phù ban đầu (9.1.2) trong môi trường vi hiếu khí (6.14) ở 37 °C trong 4 h đến 6 h, rồi ủ tiếp ở 41,5 °C trong 44 h ± 4 h.

## **9.3 Phân lập**

**9.3.1** Lấy vòng que cấy vô trùng (6.11) cấy một vòng dịch cấy thu được trong môi trường tăng sinh (9.2) lên bề mặt môi trường phân lập chọn lọc thứ nhất, thạch mCCD (5.3).

Tiến hành tương tự đối với môi trường phân lập chọn lọc *Campylobacter* đã chọn.

CHÚ THÍCH: Tốt nhất để lấy môi trường phân lập thứ hai là dựa theo nguyên tắc khác với thạch mCCD. Các ví dụ về môi trường phân lập được sử dụng là thạch Skirrow, thạch Karmali và thạch Preston (xem Thư mục tài liệu tham khảo).

**9.3.2** Ủ các đĩa (9.3.1) ở 41,5 °C trong môi trường vi hiếu khí (6.14).

**9.3.3** Sau khi ủ trong 44 h ± 4 h, kiểm tra các đĩa về các khuẩn lạc đặc trưng và/hoặc các khuẩn lạc nghi ngờ của *Campylobacter*.

Các khuẩn lạc điển hình có màu xám trên thạch mCCD, thường có lớp 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 hơn. Có thể xuất hiện các khuẩn lạc dạng khác.

## **9.4 Kháng định các loài *Campylobacter***

### **9.4.1 Khái quát**

Vì vi khuẩn suy giảm rất nhanh trong không khí, do đó các qui trình mô tả trong 9.4.2 đến 9.4.6 cần được thực hiện ngay.

### **9.4.2 Chọn các khuẩn lạc để kháng định**

**9.4.2.1** Để kháng định, từ mỗi đĩa của mỗi môi trường chọn lọc (9.3.1) lấy ít nhất một khuẩn lạc được coi là *Campylobacter* điển hình hoặc nghi ngờ và bốn khuẩn lạc nữa nếu khuẩn lạc thứ nhất là âm tính.

**9.4.2.2** Cấy vạch từng khuẩn lạc đã chọn lên đĩa thạch huyết Columbia (5.4.1) để cho phát triển các khuẩn lạc phân lập tốt. Ủ các đĩa 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 trong điều kiện hiếu khí ở 41,5 °C và sự có mặt của oxidaza.

### **9.4.3 Kiểm tra hình thái và tính di động**

**9.4.3.1** Hòa một khuẩn lạc từ đĩa thạch huyết Columbia (9.4.2.2) vào 1 ml canh thang Brucella (5.4.2) và kiểm tra về hình thái và tính di động bằng kính hiển vi (6.13).

**9.4.3.2** Giữ tất cả các khuẩn lạc (9.4.2.2) để kiểm tra tiếp theo trong đó các trực khuẩn uốn cong có di động xoáy “mở nút chai” được tìm thấy (9.4.3.1).

#### **9.4.4 Nghiên cứu sự phát triển ở 25 °C (vi hiếu khí)**

Sử dụng que cấy vòng (6.11) lấy các khuẩn lạc đã phân lập trong 9.4.2.2, cấy lên bề mặt đĩa thạch huyết Columbia (5.4.1).

Ủ các đĩa ở 25 °C trong môi trường vi hiếu khí (6.14) trong 44 h ± 4 h.

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

#### **9.4.5 Nghiên cứu sự phát triển ở 41,5 °C (hiếu khí)**

Sử dụng một vòng que cấy (6.11) lấy các khuẩn lạc đã phân lập trong 9.4.2.2, cấy lên bề mặt đĩa thạch huyết Columbia (5.4.1).

Ủ các đĩa ở 41,5 °C trong môi trường hiếu khí (6.14) trong 44 h ± 4 h.

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

#### **9.4.6 Phát hiện oxidaza**

Dùng vòng cấy hoặc que cấy bằng platin/iridi hoặc đĩa thủy tinh (6.11), lấy một phần của mỗi khuẩn lạc được tách biệt rõ (9.4.2.2) từ mỗi đĩa và ria cấy lên giấy lọc đã được làm ẩm bằng thuốc thử oxidaza (5.4.3); viền ngoài có màu tím hoa cà, màu tím hoặc màu xanh đậm trong 10 giây 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).

#### **9.4.7 Diễn giải kết quả**

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

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

Hình thái học (9.4.3)	Trực khuẩn uốn cong nhỏ
Tính di động (9.4.3)	Đặc trưng
Mọc trong điều kiện vi hiếu khí ở 25 °C (9.4.4)	–
Mọc trong điều kiện hiếu khí ở 41,5 °C (9.4.5)	–
Oxidaza (9.4.6)	+

## TCVN 7715-1 : 2007

Có mặt các *Campylobacter* spp. nếu có ít nhất một khuẩn lạc cho thấy các đặc trưng ở trên.

### 9.5 Nhận dạng các loài *Campylobacter* (tùy chọn)

#### 9.5.1 Khái quát

Trong số các *Campylobacter* phát triển ở 41,5 °C, các loài thường gặp nhất là *Campylobacter jejuni* và *Campylobacter coli*. Tuy nhiên, các loài khác thường gặp được mô tả (*Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis* và một số loài khác); các đặc trưng được nêu trong Bảng 2 cho phép phân biệt chúng.

#### 9.5.2 Phát hiện catalaza

Đối với mỗi khuẩn lạc được chọn trong 9.4.2.2, nhúng một vòng dịch cấy vào một giọt dung dịch hydro peroxit (5.4.4) lên một lam kính sạch.

Phép thử được coi là dương tính nếu bọt bong bóng xuất hiện trong vòng 30 s.

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 *Staphylococcus aureus* NCTC 8532 (kiểm chứng dương tính), *Enterococcus faecalis* NCTC 775 (kiểm chứng âm tính).

#### 9.5.3 Phát hiện độ nhạy với axit nalidixic và xephalotin

Dùng vòng que cấy (6.11) lấy từng khuẩn lạc được chọn trong 9.4.2.2 để chuẩn bị huyền phù trong canh thang Brucella (5.4.2) ở mật độ 0,5 trên thang McFarland.

Pha loãng huyền phù này với tỷ lệ 1/10 sử dụng cùng một canh thang.

Phủ ngập một lớp huyền phù lên bề mặt đĩa thạch huyết Hinton Mueller 5 % (5.4.6).

Để cho tiếp xúc 5 phút, sau đó để ráo huyền phù.

Sấy khô đĩa 10 phút trong tủ sấy (6.2) để ở 37 °C.

Đặt đĩa axit nalidixic và đĩa xephalotin (5.4.7) lên mặt đĩa thạch.

Ủ các đĩa với nắp lật úp, ở 37 °C trong 22 h ± 2 h trong môi trường vi hiếu khí (6.14).

Diễn giải kết quả về sự phát triển vi khuẩn theo cách sau đây:

- phát triển trong vùng tiếp xúc với đĩa được phân loại là **bền vững (có khả năng đề kháng)**;
- có mặt một vùng ức chế với mọi kích cỡ được phân loại là **có khả năng cảm nhận**.

#### 9.5.4 Phát hiện thủy phân hipurat

Đối với mỗi khuẩn lạc được chọn trong 9.4.2.2, sử dụng que cấy vòng (6.11) lấy một vòng dịch cấy để chuẩn bị huyền phù trong ống phân giải huyết (6.7) chứa 0,4 ml dung dịch natri hipurat (5.4.5), chú ý không được để lẫn thạch.

Lắc để trộn kỹ và ủ 2 h trong nồi cách thủy (6.4) để ở 37 °C hoặc ủ ấm 4 h ở 37 °C.

Cẩn thận thêm 0,2 ml dung dịch ninhydrin (5.4.5) lên đỉnh của dung dịch natri hipurat. Không lắc.

Diễn giải kết quả sau khi ủ thêm 10 min trên nồi cách thủy (6.4) hoặc để trong tủ ấm ở 37 °C.

Màu tím đậm chứng tỏ phản ứng dương tính.

Màu tím nhạt hoặc không đổi màu chứng tỏ phản ứng âm tính.

Khẳng định các kết quả sử dụng các kiểm chứng dương tính và âm tính. Ví dụ về các chủng kiểm chứng thích hợp là *Campylobacter jejuni* NCTC 11351 (kiểm chứng dương tính), *Campylobacter coli* NCTC 11366 (kiểm chứng âm tính).

### 9.5.5 Phát hiện thủy phân indoxyl axetat

Cho một khuẩn lạc được chọn trong 9.4.2.2 lên đĩa indoxyl axetat (5.4.8) và thêm một giọt nước cất vô trùng. Để phản ứng được rõ ràng, cần sử dụng một vòng đầy các khuẩn lạc.

Nếu indoxyl axetat bị thủy phân, thì màu sắc sẽ chuyển sang xanh đậm trong 5 min đến 10 min. Nếu màu sắc không đổi chứng tỏ sự thủy phân không xảy ra.

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 *Campylobacter jejuni* NCTC 11351 (kiểm chứng dương tính), *Campylobacter lari* NCTC 11352 (kiểm chứng âm tính).

### 9.5.6 Diễn giải

Các loài *Campylobacter* phát triển ở 41,5 °C có thể được nhận dạng theo Bảng 2.

**Bảng 2 – Đặc trưng của các loài *campylobacter***

Đặc trưng	<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>	<i>C.lari</i>	<i>C.upsaliensis</i>
Catalaza (9.5.2)	+	+	+	- hoặc nhẹ
Axit nalidixic (9.5.3)	S <sup>a</sup>	S <sup>a</sup>	R/S <sup>b</sup>	S
Xephalotin (9.5.3)	R	R	R	S
Thủy phân hipurat (9.5.4)	+	-	-	-
Indoxyl axetat (9.5.5)	+	+	-	+
Chú giải: + = dương tính; S = nhạy; R = bền và - = âm tính				
<sup>a</sup> Cho thấy tăng bền vững với axit nalidixic của các chủng <i>C.jejuni</i> và <i>C.coli</i>				
<sup>b</sup> Tồn tại <i>C.lari</i> vừa nhạy vừa bền.				

## **10 Biểu thị kết quả**

Theo phần diễn giải các kết quả, nêu rõ sự có mặt hay không có mặt *Campylobacter* trong phần mẫu thử x g hoặc x ml sản phẩm. [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

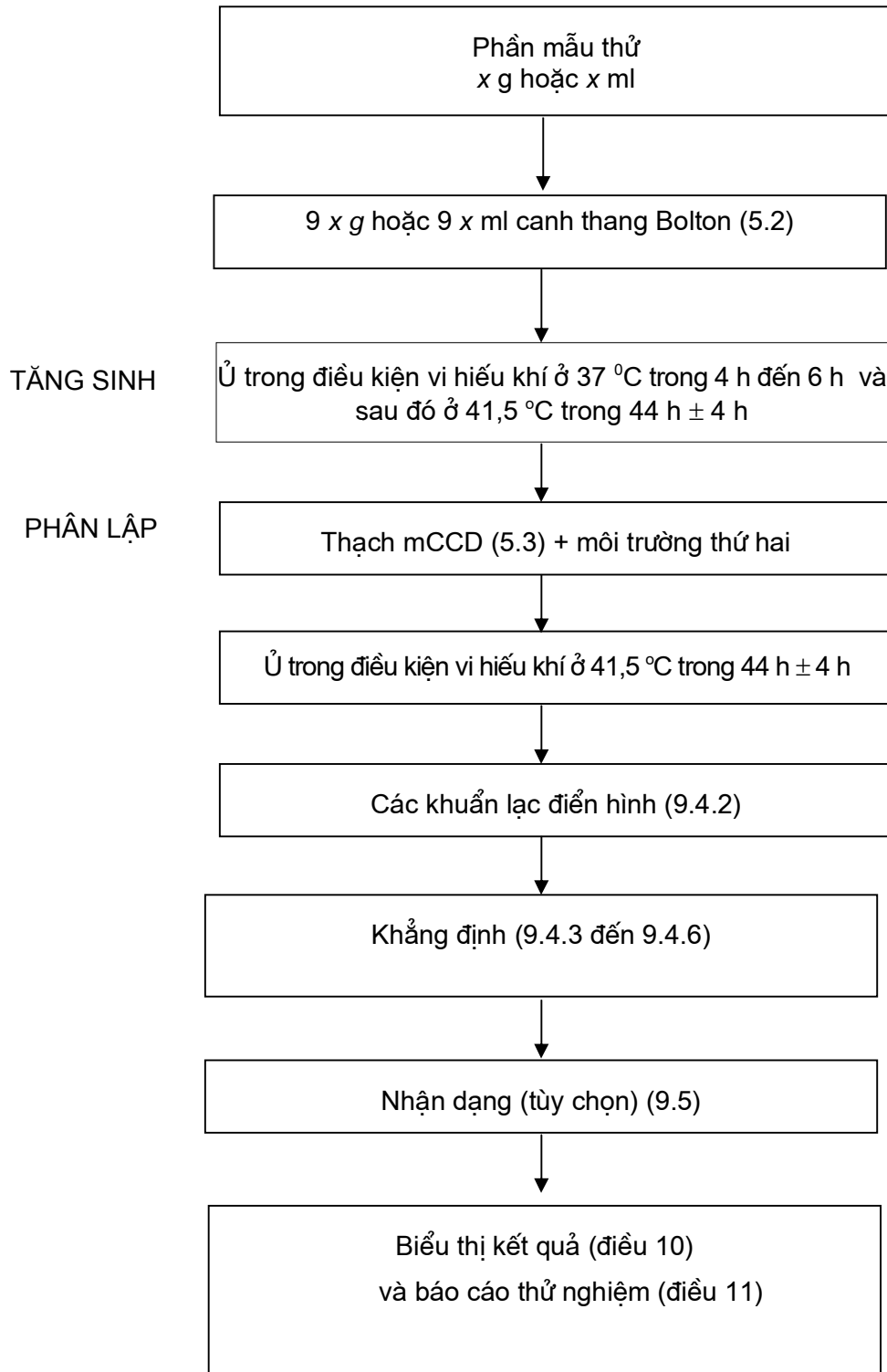
## **11 Báo cáo thử nghiệm**

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) mọi sai lệch trong môi trường tăng sinh hoặc môi trường phân lập thứ nhất hoặc các điều kiện ủ đã sử dụng;
- d) môi trường phân lập thứ hai đã sử dụng;
- e) 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;
- f) các kết quả thử nghiệm thu được.

**Phụ lục A**

(Qui định)

**Sơ đồ qui trình**

**Phụ lục B**

(Qui định)

**Thành phần và chuẩn bị môi trường nuôi cấy và thuốc thử****B.1 Canh thang Bolton****B.1.1 Môi trường cơ bản****B.1.1.1 Thành phần**

Dịch thuỷ phân mô động vật bằng enzym	10,0 g
Lactalbumin hydrolysat	5,0 g
Cao men	5,0 g
Natri clorua	5,0 g
Natri pyruvat	0,5 g
Natri metabisulphit	0,5 g
Natri cacbonat	0,6 g
Axit $\alpha$ -Ketoglutaric	1,0 g
Haemin (được hòa tan trong natri hydroxit 0,1 %)	0,01 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 sôi, nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH của môi trường hoàn chỉnh là  $7,4 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , nếu cần. Phân phối môi trường cơ bản vào các bình cầu có dung tích thích hợp. Khử trùng môi trường 15 min ở  $121^{\circ}\text{C}$  trong nồi hấp áp lực (6.1).

**B.1.2 Huyết ngựa đã khử fibrin phân giải vô trùng**

Sử dụng huyết ngựa đã phân giải saponin hoặc được phân giải bằng cấp đông rồi rã đông.

**B.1.3 Dung dịch kháng sinh**



**B.1.3.1 Thành phần**

Xefoperazon	0,02 g
Vancomyxin	0,02 g
Trimetoprim lactat	0,02 g
Amphotericin B	0,01 g
Etanol/nước cất vô trùng 50/50 (phần thể tích)	5 ml

**B.1.3.2 Chuẩn bị**

Hòa tan các thành phần trong hỗn hợp của etanol và nước cất vô trùng với tỷ lệ 50/50.

**B.1.4 Môi trường hoàn chỉnh****B.1.4.1 Thành phần**

Môi trường cơ bản (B.1.1)	1 000 ml
Huyết ngựa đã khử fibrin phân giải vô trùng (B.1.2)	50 ml
Dung dịch kháng sinh (B.1.3)	5 ml

**B.1.4.2 Chuẩn bị**

Bổ sung huyết một cách vô trùng vào môi trường cơ bản ở nhiệt độ từ 47 °C đến 50 °C, tiếp theo đến dung dịch kháng sinh và trộn. Phân phối môi trường này một cách vô trùng vào các ống hoặc các bình có dung tích thích hợp (xem 9.1.2) để thu được các phần cần thiết cho phép thử. Nếu môi trường tăng sinh đã được chuẩn bị trước, thì môi trường này không được để quá 4 giờ ở nhiệt độ phòng, hoặc nếu bảo quản ở nơi tối với nhiệt độ  $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  thì không quá 7 ngày.

**B.1.5 Kiểm tra tính năng**

Tính năng của canh thang Bolton phải được kiểm tra theo các phương pháp và các tiêu chí trong ISO/TS 11133-2. Các ví dụ về các chủng kiểm chứng thích hợp là *Campylobacter jejuni* NCTC 11351 hoặc ATCC 33291 với các tiêu chí sau: > 10 khuẩn lạc trên thạch deoxycolat xefoperazon than cải biến (mCCD) sau khi ủ vi hiếu khí ở 41,5 °C trong 44 h  $\pm$  4 h.

**B.2 Thạch deoxycolat xefoperazon than cải biến (mCCD)****B.2.1 Môi trường cơ bản**

## TCVN 7715-1 : 2007

### B.2.1.1 Thành phần

Cao thịt	10,0 g
Dịch thuỷ phân mô động vật bằng enzym	10,0 g
Natri clorua	5,0 g
Than củi	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 <sup>1)</sup>
Nước	1 000 ml

### B.2.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần cơ bản hoặc môi trường cơ bản hoàn chỉnh khô trong nước, bằng cách đun đến sôi. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là  $7,4 \pm 0,2$  ở  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 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  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## B.2.2 Dung dịch kháng sinh

### B.2.2.1 Thành phần

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

### B.2.2.2 Chuẩn bị

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

## B.2.3 Môi trường hoàn chỉnh

### B.2.3.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (B.2.1)	1 000 ml
Dung dịch kháng sinh (B.2.3)	5 ml

---

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

**B.2.3.2 Chuẩn bị**

Cho dung dịch kháng sinh vào môi trường cơ bản, làm nguội đến 47 °C đến 50 °C sau đó khuấy cẩn thận. Rót khoảng 15 ml môi trường hoàn chỉnh vào các đĩa Petri vô trùng. 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  $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  thì không quá 7 ngày.

**B.2.4 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.

**B.3 Thạch huyết Columbia****B.3.1 Môi trường cơ bản****B.3.1.1 Thành phần**

Dịch thủy 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 <sup>1)</sup>
Nước	1 000 ml

**B.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 nóng. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là  $7,3 \pm 0,2$  ở 25 °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 °C.

**B.3.2 Huyết cừu vô trùng đã khử fibrin****B.3.3 Môi trường hoàn chỉnh****B.3.3.1 Thành phần**

Môi trường cơ bản (B.3.1)	1 000 ml
Huyết cừu vô trùng đã khử fibrin (B.3.2)	50 ml

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

**B.3.3.2 Chuẩn bị**

Cho huyết một cách vô trùng vào môi trường cơ bản, làm nguội đến 47 °C đến 50 °C. Rót khoảng 15 ml môi trường hoàn chỉnh vào các đĩa Petri vô trùng. 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 30 phút trong tủ sấy (6.2) 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 3 °C ± 2 °C thì không quá 7 ngày.

**B.4 Canh thang Brucella**

**B.4.1 Thành phần**

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

**B.4.2 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. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là 7,0 ± 0,2 ở 25 °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 °C.

**B.5 Thuốc thử phát hiện oxidaza**

**B.5.1 Thành phần**

<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametyl-1,4-phenylenediamin dihydro clorua	1,0 g
Nước	1 000 ml

**B.5.2 Chuẩn bị**

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

**B.6 Thuốc thử phát hiện thủy phân hipurat**

**B.6.1 Dung dịch natri hipurat**

**B.6.1.1 Thành phần**

Natri hipurat	10 g
Dung dịch muối đệm phosphat (PBS) bao gồm:	
natri clorua	8,5 g
dinatri hydrophosphat ngậm hai phân tử nước ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	8,98 g
natri dihydrophosphat ngậm một phân tử nước ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	2,71 g
Nước, vừa đủ	1 000 ml

**B.6.1.2 Chuẩn bị**

Hòa tan natri hipurat trong dung dịch PBS. Lọc để khử trùng. Phân phối thuốc thử một cách vô trùng với các lượng 0,4 ml vào các ống nghiệm nhỏ có dung tích thích hợp (6.7). Bảo quản ở khoảng  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

**B.6.2 Dung dịch ninhydrin, 3,5 % (khối lượng/thể tích)****B.6.2.1 Thành phần**

Ninhydrin	1,75 g
Axeton	25 ml
Butanol	25 ml

**B.6.2.2 Chuẩn bị**

Hòa tan ninhydrin trong hỗn hợp axeton/butanol. Bảo quản dung dịch nơi tối trong tủ lạnh tối đa 1 tuần.

**B.7 Thạch huyết Hinton Mueller****B.7.1 Môi trường cơ bản****B.7.1.1 Thành phần**

Dịch thủy phân mô động vật bằng enzym	6,0 g
Dịch thủy phân casein bằng enzym	17,5 g
Tinh bột, có thể hòa tan	1,5 g
Thạch	8,0 g đến 18,0 g <sup>1)</sup>
Nước	1 000 ml

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

## **TCVN 7715-1 : 2007**

### **B.7.1.2 Chuẩn bị**

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

### **B.7.2 Huyết cừu vô trùng đã khử fibrin**

#### **B.7.3 Môi trường hoàn chỉnh**

##### **B.7.3.1 Thành phần**

Môi trường cơ bản (B.7.1)	1 000 ml
Huyết cừu vô trùng đã khử fibrin (B.7.2)	50 ml

##### **B.7.3.2 Chuẩn bị**

Cho huyết một cách vô trùng vào môi trường cơ bản, làm nguội đến  $47\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  sau đó trộn đều. Rót khoảng 15 ml môi trường hoàn chỉnh vào các đĩa Petri vô trùng. 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  $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  thì không quá 7 ngày.

## **B.8 Đĩa indoxyl axetat**

### **B.8.1 Thành phần**

Indoxyl axetat	0,1 g
Axeton	1 ml

### **B.8.2 Chuẩn bị**

Hòa tan indoxyl axetat trong axeton. Thêm 25  $\mu\text{l}$  đến 50  $\mu\text{l}$  dung dịch này vào các đĩa giấy trắng (đường kính đĩa từ 0,6 cm đến 1,2 cm). Sau khi để khô ở nhiệt độ phòng, bảo quản các đĩa này ở  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong ống nghiệm màu nâu hoặc trong chai có chứa silica gel.

## Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] BAYLIS, C.L. et al. *Comparison of three enrichment media for the isolation of Campylobacter spp. from foods*. J. Appl. Microbiol. 2000, **89**, pp. 884-891
  - [2] BOLTON, F.J. and ROBERTSON, L. *A selective medium for isolating Campylobacter jejuni/coli*. J. Clin. Pathol. 1982, **35**, pp. 462-467
  - [3] BOLTON, F.J. et al. *A blood-free selective medium for the isolation of Campylobacter jejuni from faeces*. J. Clin. Microbiol. 1984, **19**, pp. 169-171
  - [4] BOLTON, F.J. et al. *Detection of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in foods by enrichment culture and polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay*. J. Food Prot. 2002, **65**, pp. 760-767
  - [5] CORRY, J.E.L. et al. (eds). *Handbook of culture media for food microbiology*. Progress in Industrial Microbiology. Vol. 37. Elsevier, Amsterdam, 2003
  - [6] HUNT, J.M. et al. *Campylobacter*. In: Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, 8<sup>th</sup> Edition, AOAC, Arlington Va, USA, 1998
  - [7] HUTCHINSON, D.N. and BOLTON, F.J. *Improved blood-free selective medium for the isolation of Campylobacter jejuni from faecal specimen*. J. Clin. Pathol. 1984, **37**, pp. 956-957
  - [8] KARMALI, M.A. et al. *Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of Campylobacter organisms from faeces*. J. Clin. Microbiol. 1986, **23**, pp. 456-459.
  - [9] SKIRROW, M.B. *Campylobacter enteritis: a new disease*. Brit. Med. J. 1977, **2**, pp. 9-11
-