

Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung về định lượng E.coli giả định – Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất

Microbiology – General guidance for enumeration of presumptive Escherichia coli – Most probable number technique

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra hướng dẫn chung để định lượng E.coli giả định có trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi bằng kỹ thuật nuôi cấy môi trường lỏng và tính số có xác suất lớn nhất (MPN) sau khi ủ ở 35°C hoặc 37°C (nhiệt độ này cần được thoả thuận giữa các bên có liên quan), sau đó ủ ở 45°C.

Chú ý – Một số E.coli gây bệnh không phát triển ở 45°C.

Khả năng áp dụng của tiêu chuẩn này bị hạn chế bởi kết quả có độ dao động lớn, do đó phương pháp này chỉ nên sử dụng và giải thích kết quả theo thông tin nêu trong 10.4.

2 Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 4881:1989 (ISO 6887:1983), Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung về cách pha chế các dung dịch pha loãng để kiểm nghiệm vi sinh vật.

TCVN 6404:1998 (ISO 7218:1997), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc – Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.

3 Định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa sau đây:

3.1 E.coli giả định (presumptive): Vi khuẩn ở 45°C lên men lactoza, và sinh khí, và ở 45°C sinh ra indol từ tryptophan, khi phép thử được tiến hành theo phương pháp được qui định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Nuôi cấy ba ống môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc nồng độ kép [(5.3.1a)]¹⁾ với một lượng mẫu thử qui định nếu sản phẩm ban đầu là chất lỏng hoặc với một lượng huyền phù ban đầu qui định nếu các sản phẩm ở dạng khác.

4.2 Nuôi cấy ba ống môi trường tăng sinh lỏng nồng độ đơn [(5.3.1b)]¹⁾ với một lượng mẫu thử quy định nếu sản phẩm ban đầu là chất lỏng hoặc với một lượng huyền phù ban đầu qui định nếu các sản phẩm ở dạng khác.

Sau đó, trong cùng điều kiện, nuôi cấy môi trường [(5.3.1b)] với các dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc huyền phù ban đầu.

4.3 Ủ ấm các ống môi trường nồng độ đơn và nồng độ kép ở 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong 24 h - 48 h. Xét nghiệm các ống sinh khí.

4.4 Từ các ống môi trường nồng độ đơn và nồng độ kép đã sinh khí, nuôi cấy một loạt các ống mới chứa môi trường lỏng chọn lọc

4.5 Ủ ở 45°C từ 24 h - 48 h và xét nghiệm loạt ống nghiệm mới (4.4) về sinh khí.

4.6 Từ các ống môi trường chọn lọc đã sinh khí cấy một loạt các ống nghiệm mới chứa nước trypton.

4.7 Ủ ở 45°C từ 24 h - 48 h và xét nghiệm loạt ống nghiệm mới (4.6) về sinh indol.

4.8 Xác định số có xác suất lớn nhất của E.coli giả định theo bảng MPN (xem phụ lục A) ứng với số lượng ống đã ủ cho thấy sinh khí trong môi trường chọn lọc, trong môi trường indol và trong nước trypton.

5 Môi trường nuôi cấy, dung dịch pha loãng và thuốc thử

5.1 Khái quát

Thực hành các phòng thí nghiệm, xem TCVN 6404:1998 (ISO 7218).

5.2 Dịch pha loãng, xem TCVN 4881:1989 (ISO 6887:1997), điều 5, và tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm trong điều kiện xét nghiệm.

5.3 Canh thang tryptoza lauryl sunfat (môi trường tăng sinh chọn lọc)

¹⁾ Nếu cần, có thể sử dụng môi trường tăng sinh lỏng khác, trước khi nuôi cấy môi trường chọn lọc.

5.3.1 Thành phần

	a) Môi trường nồng độ kép	b) Môi trường nồng độ đơn
Tryptoza	40,0 g	20,0 g
Lactoza	10,0 g	5,0 g
Dikali hidro phosphat (K_2HPO_4)	5,5 g	2,75 g
Kali dihidro phosphat (KH_2PO_4)	5,5 g	2,75 g
Natri clorua	10,0 g	5,0 g
Natri lauryl sunfat [$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$]	0,2 g	0,1 g
Nước	1 000 ml	1 000 ml

5.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi thanh trùng bằng 6,8 ở 25°C, nếu cần.

Phân phối từng lượng môi trường 10 ml vào các ống có kích thước 16 mm x 160 mm (6.4) chứa ống Durham (6.6) đối với môi trường nồng độ đơn và vào các ống thử có kích thước 20 mm x 200 mm (6.4) chứa các ống Durham (6.6) đối với môi trường nồng độ kép.

Thanh trùng trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút.

Các ống Durham không được chứa bọt khí sau khi thanh trùng.

5.4 Ống canh thang EC (Môi trường chọn lọc thứ hai)

5.4.1 Thành phần

Tryptoza hoặc trypticaza	20,0 g
Lactoza	5,0 g
Muối mật (bile salts) số 3 ¹⁾	1,5 g
Dikali hidro phosphat (K_2HPO_4)	4,0 g
Kali dihidro phosphat (KH_2PO_4)	1,5 g
Natri clorua	5,0 g
Nước	1 000 ml

1) Xem ICMSF vi sinh vật trong thực phẩm, xuất bản 32, lần thứ nhất và lần thứ hai, trang 280, trường đại học báo chí Toronto, CANADA.

TCVN 6846 : 2001

5.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi thanh trùng bằng 6,8, ở 25°C, nếu cần.

Phân phối từng lượng môi trường 10 ml vào các ống có kích thước 16 mm x 160 mm (6.4) chứa ống Durham (6.6).

Thanh trùng trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút.

Các ống Durham không được chứa bọt khí sau khi thanh trùng.

5.5 Nước trypton

5.5.1 Thành phần

Trypton	10,0 g
Natri clorua	5,0 g
Nước	1 000 ml

5.5.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi thanh trùng bằng 7,3 ở 25°C, nếu cần.

Phân phối từng lượng môi trường từ 5 ml đến 10 ml vào các ống nghiệm có kích thước 16 mm x 160 mm (6.4).

Thanh trùng trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút.

5.6 Thuốc thử Indol (Thuốc thử Kovacs)

5.6.1 Thành phần

4-Dimethylaminobenzaldehyd	5,0 g
2-Metyl butan-1-hoặc pentan-1-ol	75,0 ml
A xit hydrocloric (ρ_{20} 1,18 đến 1,19 g/ml)	25,0 ml

5.6.2 Chuẩn bị

Hoà tan 4-Dimethylaminobenzaldehyd trong cồn bằng cách đun nhẹ trong nồi cách thủy, duy trì ở nhiệt độ khoảng từ 50°C - 55°C.

Làm nguội và thêm a xit.

Bảo quản tránh ánh sáng và giữ ở nhiệt độ khoảng 4°C.

Thuốc thử phải có màu vàng sáng hoặc nâu sáng.

6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Chú thích 1 – Có thể dùng thiết bị, dụng cụ dùng một lần thay cho việc sử dụng lại các dụng cụ thủy tinh nếu chúng đáp ứng được các yêu cầu tương tự.

Thiết bị kỹ thông thường của phòng thí nghiệm phân tích vi sinh vật và đặc biệt là:

6.1 Thiết bị để thanh trùng khô (tủ sấy) hoặc để thanh trùng ướt (nồi hấp áp lực)

Xem TCVN 6404:1998 (ISO 7218).

6.2 Tủ ấm, có khả năng hoạt động ở $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hoặc $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ tùy theo nhiệt độ được chấp nhận.

6.3 Nồi cách thủy, phải có khả năng duy trì ở nhiệt độ $45^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (cho phép các ống nuôi cấy được duy trì ở nhiệt độ này).

6.4 Các ống thử nghiệm, có kích thước xấp xỉ 16 mm x 160 mm và 20 mm x 200 mm.

6.5 Vòng que cấy, bằng platin/iridi hoặc niken/crom có đường kính khoảng 3 mm hoặc các túi vô trùng sử dụng một lần.

6.6 Các ống Durham, có kích thước thích hợp dùng cho các ống thử nghiệm (6.4) .

6.7 Pipet xả hết, có dung tích danh định 1 ml và 10 ml.

6.8 pH met, chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị pH ở 25°C .

7 Lấy mẫu

Phòng thí nghiệm phải nhận được mẫu đại diện trung thực, không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản. Phương pháp lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến lấy mẫu sản phẩm thì các bên liên quan nên thoả thuận với nhau về vấn đề này.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo tiêu chuẩn cụ thể thích hợp đối với sản phẩm có liên quan. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể thì các bên 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 dịch pha loãng

Xem TCVN 4881:1989 (ISO 6887) và tiêu chuẩn cụ thể thích hợp đối với sản phẩm.

Chuẩn bị đủ một số dịch pha loãng để đảm bảo cho dịch pha loãng cuối cùng và cho kết quả âm tính.

9.2 Kỹ thuật MPN

9.2.1 Cấy môi trường tăng sinh chọn lọc

9.2.1.1 Lấy ba ống nghiệm môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ kép [5.3.1a)]. Dùng pipet vô trùng (6.7) chuyển 10 ml mẫu thử nếu là chất lỏng, hoặc 10 ml huyền phù ban đầu, nếu các sản phẩm ở dạng khác, vào mỗi ống nghiệm trên.

9.2.1.2 Sau đó, lấy ba ống môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ đơn [5.3.1b)]. Dùng pipet mới vô trùng (6.7) chuyển 1 ml mẫu thử, nếu là chất lỏng, hoặc 1 ml huyền phù ban đầu, nếu các sản phẩm ở dạng khác, vào mỗi ống nghiệm trên

9.2.1.3 Đối với mỗi dịch pha loãng tiếp theo (từ 10^{-1} hoặc 10^{-2} tương ứng với mẫu thử) tiến hành theo 9.2.1.2. Dùng pipet mới vô trùng cho mỗi dung dịch pha loãng. Trộn kỹ chất nuôi cấy và môi trường.

9.2.2 Ủ ấm

Ủ các ống môi trường chọn lọc nồng độ kép (9.2.1.1) và các ống môi trường chọn lọc nồng độ đơn (9.2.1.2 và 9.2.1.3) trong tủ ấm (6.2) ở nhiệt độ 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Nếu ở giai đoạn này, hoặc sinh khí hoặc là không rõ ràng, nếu khí được tạo thành thì ủ tiếp đến $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

9.2.3 Nuôi cấy môi trường chọn lọc thứ hai

Từ mỗi ống đã được ủ theo 9.2.2 và biểu hiện sinh khí, dùng vòng que cấy (6.5) cấy 10 ml môi trường chọn lọc thứ hai (5.4) đã được đun nóng trước đến 45°C .

9.2.4 Ủ lần hai

Ủ các ống đã được ủ ở 9.2.3 trong nồi cách thuỷ (6.3) có nhiệt độ 45°C trong $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Nếu ở giai đoạn này không sinh khí thì ủ trong 48 h.

9.2.5 Nuôi cấy nước trypton

Từ mỗi ống đã được ủ theo 9.2.4 và biểu hiện sinh khí, dùng vòng que cấy (6.5) cấy vào môi trường nước trypton đã được đun nóng trước đến 45°C .

9.2.6 Ủ ấm

Ủ các ống đã được nuôi cấy theo 9.2.5 trong nồi cách thủy (6.3) có nhiệt độ 45°C trong 48 h

9.2.7 Thử sinh indol

Thêm 0,5 ml thuốc thử indol (5.6) vào các ống chứa nước trypton đã được nuôi cấy (9.2.5), trộn kỹ và xét nghiệm sau 1 phút.

9.2.8 Diễn giải

Đối với mỗi dịch pha loãng, tiến hành đếm số lượng các ống có màu đỏ trong pha cồn, chứng tỏ có indol (các ống dương tính).

10 Biểu thị kết quả

10.1 Chọn dịch pha loãng ²⁾

Đối với mỗi mẫu đã được xét nghiệm chọn ba dịch pha loãng kế tiếp nhau ứng với 10.1.1, 10.1.2 hoặc 10.1.3 miễn là thích hợp.

10.1.1 Trường hợp 1 – Tối thiểu có một dịch pha loãng lên men ba ống dương tính

Chọn dịch pha loãng cao nhất (tức là dịch pha loãng có nồng độ mẫu thấp nhất) lên men ba ống dương tính cùng với hai dịch pha loãng cao hơn tiếp theo (tức là những dịch pha loãng có nồng độ mẫu là 1/10 và 1/100 của dịch pha loãng đầu tiên được chọn), (xem bảng 1, thí dụ 1).

Xem 10.1.3.

Nếu pha loãng các dịch tiếp theo mà không đủ tạo nên dịch pha loãng cao nhất để lên men ba ống dương tính thì cần chọn để thay ba dịch pha loãng cao nhất trong các loạt (tức là những dịch pha loãng có nồng độ mẫu thấp nhất), (xem bảng 1, thí dụ 2).

10.1.2 Trường hợp 2 – Không có dịch pha loãng nào lên men ba ống dương tính

Trường hợp 1 không thể áp dụng. Chọn ba dịch pha loãng cao nhất trong loạt dịch pha loãng (tức là những dịch pha loãng có nồng độ mẫu thấp nhất), trong số đó có ít nhất một ống cho kết quả dương tính (Xem bảng 1, thí dụ 3).

Xem 10.1.3.

²⁾ Trong điều này, huyền phù ban đầu, và nếu cần, mẫu thử được coi là dịch pha loãng

10.1.3 Các trường hợp đặc biệt

Trong tất cả các trường hợp, khi có nhiều hơn một trong ba dịch pha loãng được chọn theo 10.1.1 và 10.1.2 không lên men các ống dương tính, chọn từ các dịch pha loãng này dịch pha loãng thấp nhất không lên men các ống dương tính (tức là dịch pha loãng có nồng độ mẫu cao nhất) và hai dịch pha loãng thấp hơn tiếp theo trong các dịch pha loãng (tức là dịch pha loãng có nồng độ mẫu 10 lần và 100 lần dịch pha loãng đầu tiên được chọn), (xem bảng 1, thí dụ 4 & 5), trừ khi các ống dương tính chỉ được thấy ở mức dịch pha loãng đầu tiên được chuẩn bị từ mẫu. Trong trường hợp cuối, nếu cần thiết, chọn ba dịch pha loãng đầu tiên để tính MPN, thậm chí các loạt pha loãng này bao gồm hai dịch pha loãng không lên men các ống dương tính.

10.2. Xác định chỉ số MPN

10.2.1 Kiểm tra theo số lượng mẫu đã được xét nghiệm theo từng lô, dùng bảng A.1, khi tần suất của số lượng ống dương tính ứng với các độ pha loãng được chọn trong 10.1 có thể chấp nhận được theo phương pháp thống kê. Sự chấp nhận phụ thuộc vào cả số lượng mẫu được kiểm tra và phụ thuộc vào cả quyết định có chấp nhận hay không chấp nhận theo các kết quả cấp hạng 2 hoặc hạng 3 (xem bảng A.2).

Thí dụ: Nếu chỉ có kết quả cấp hạng 1 được chấp nhận, tần suất 221 chỉ được chấp nhận khi 10 mẫu (lô liên quan) được xét nghiệm. Tuy nhiên, nếu kết quả cấp hạng 2 nhỏ hơn cũng có thể được chấp nhận, tần suất 221 cũng chỉ được chấp nhận khi 2, 3 hoặc 5 mẫu được xét nghiệm. Tuy nhiên, khi tần suất 221 là kết quả của xét nghiệm đơn thì nó không bao giờ được chấp nhận.

10.2.2 Đối với mỗi tần suất tìm được để chấp nhận theo 10.2.1, dùng bảng A.1 để có được chỉ số MPN.

10.3 Tính toán số xác suất lớn nhất (MPN)

Lấy số E.coli giả định trên mililit hoặc trên gam của sản phẩm bằng cách nhân chỉ số MPN (xem 10.2) với nghịch đảo của độ pha loãng thấp nhất đã được chọn (tức là dịch pha loãng có nồng độ mẫu cao nhất).

Khi độ pha loãng thấp nhất được chọn ứng với các ống đã được chuẩn bị với môi trường nồng độ kép (nuôi cấy với 10 ml), trước hết chia chỉ số MPN cho 10.

Biểu thị kết quả bằng một số nằm trong khoảng từ 1,0 và 9,9 nhân với 10^x , trong đó x là lũy thừa của 10.

Nếu MPN nhỏ hơn 0,3 vi sinh vật trên mililit hoặc trên gam và nếu sử dụng quy trình thích hợp đối với số E.colin giả định thấp (xem 9.2.1) biểu thị kết quả theo cách sau: "Không có E.coli giả định trong 1 ml hoặc trong 1 g sản phẩm"

10.4 Độ chụm

Kết quả có thể dao động lớn khi áp dụng kỹ thuật MPN. Kết quả nhận được theo phương pháp này cần phải sử dụng hết sức thận trọng.

Giới hạn tin cậy cho ở phụ lục A.

Thí dụ: Đối với mẫu đặc, có 95% trường hợp giới hạn tin cậy dao động từ 13 đến 200 Escherichia coli trong 1 g đối với MPN bằng $7,4 \times 10^1$ Escherichia coli trong 1 g, và từ 4 đến 99 Escherichia coli trong 1 g đối với MPN bằng $2,4 \times 10^1$ Escherichia coli trong 1 g.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải quy định phương pháp đã sử dụng, nhiệt độ ủ ấm và kết quả thử thu được. Báo cáo thử nghiệm cũng phải đề cập đến tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc những điều được coi là tùy ý cũng như các sự cố ảnh hưởng đến các kết quả thử.

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.

Bảng 1 – Thí dụ lựa chọn các kết quả dương tính đối với việc tính toán MPN

Mẫu	Số ống dương tính nhận được từ ba ống được ủ ấm đối với số mẫu được nuôi cấy trên ống ¹⁾						MPN ²⁾	
	Sản phẩm lỏng	10 ml	1 ml	10 ⁻¹ ml	10 ⁻² ml	10 ⁻³ ml	Sản phẩm lỏng ml ⁻¹	Các sản phẩm ở dạng khác g ⁻¹
	Các sản phẩm ở dạng khác	1 g	10 ⁻¹ g	10 ⁻² g	10 ⁻³ g	10 ⁻⁴ g		
1		3	3	2	1	0	1,5 x 10 ¹	1,5 x 10 ²
2		3	3	3	0		2,4 x 10 ¹	2,4 x 10 ²
3		2	2	1	1	0	7,4	7,4 x 10 ¹
4		3	3	0	0	0	2,4	2,4 x 10 ¹
5		2	2	0	1	0	2,1 x 10 ⁻¹	2,1

1) **Số đậm:** Tổ hợp được chọn.

2) Được tính toán khi sử dụng chỉ số MPN cho ba ống (bảng A.1).

Phụ lục A

(Qui định)

Bảng MPN³⁾

Bảng A.1 – Bảng MPN đối với 3 x 1 g (ml), 3 x 0,1 g (ml) và 3 x 0,01 g (ml)

Số kết quả dương tính			Chỉ số MPN	Cấp hạng ¹⁾ khi số mẫu (đối với lô) được thử					Giới hạn tin cậy			
				1	2	3	5	10	≥ 95%	≥ 95%	≥ 99%	≥ 99%
0	0	0	<0,30						0,00	0,94	0,00	1,40
0	0	1	0,30	3	2	2	2	1	0,01	0,95	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	1	1	1	1	0,01	1,00	0,00	1,60
0	1	1	0,61	0	3	3	3	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0	2	0	0,62	3	2	2	2	1	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0	0,94	0	0	0	0	3	0,35	3,50	0,18	4,60
1	0	0	0,36	1	1	1	1	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	0	1	0,72	2	2	1	1	1	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	2	1,1	0	0	0	3	3	0,4	3,5	0,2	4,6
1	1	0	0,74	1	1	1	1	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,1	3	3	2	2	2	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	0	1,1	2	2	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	1	1,5	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
1	3	0	1,6	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
2	0	0	0,92	1	1	1	1	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,4	2	1	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
2	0	2	2,0	0	3	3	3	3	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	0	1,5	1	1	1	1	1	0,4	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	2	2	1	1	1	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	2	2,7	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	0	2,1	1	1	1	1	1	0,5	4,0	0,2	5,6
2	2	1	2,8	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	2	3,5	0	0	0	0	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	0	2,9	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	1	3,6	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
3	0	0	2,3	1	1	1	1	1	0,5	9,4	0,3	14,2

3) See DE MAN, J.C. MPN tables, corrected. Eur. J. Appl. Biotechnol., 17, 1983, pp 301-305.

Bảng A.1 (Tiếp theo)

3	0	1	3,8	1	1	1	1	1	0,9	10,4	0,5	15,7
3	0	2	6,4	3	3	2	2	2	1,6	18,1	1,0	25,0
3	1	0	4,3	1	1	1	1	1	0,9	18,1	0,5	25,0
3	1	1	7,5	1	1	1	1	1	1,7	19,9	1,1	27,0
3	1	2	12	3	2	2	2	1	3	36	2	44
3	1	3	16	0	0	0	3	3	3	38	2	52
3	2	0	9,3	1	1	1	1	1	1,8	36,0	1,2	43,0
3	2	1	15	1	1	1	1	1	3	38	2	52
3	2	2	21	2	1	1	1	1	3	40	2	56
3	2	3	29	3	3	3	2	2	9	99	5	152
3	3	0	24	1	1	1	1	1	4	99	3	152
3	3	1	46	1	1	1	1	1	9	198	5	283
3	3	2	110	1	1	1	1	1	20	400	10	570
3	3	3	>110									

1) Xem bảng A.2 để hiểu cấp hạng.

Bảng A.2 – Giải thích các cấp hạng về kết quả

Trước khi bắt đầu thử nghiệm cần quyết định xem sẽ chấp nhận cấp hạng nào, nghĩa là chỉ cấp hạng 1, 1 và 2 hoặc thậm chí 1, 2 và 3. Việc quyết định dựa trên các kết quả là hết sức quan trọng, chỉ chấp nhận kết quả của cấp hạng 1 hoặc tối đa kết quả của cấp hạng 1 và cấp hạng 2. Kết quả của cấp hạng 0 cần được xem xét hết sức cẩn thận

Cấp hạng	Định nghĩa
1	<p>Khi số lượng vi khuẩn trong mẫu bằng số MPN tìm được, thì kết quả nằm trong số có khả năng cao nhất thu được. Hầu như chỉ có 5% khả năng nhận được kết quả nhỏ hơn giá trị nhỏ nhất ở cấp hạng này.</p>
2	<p>Khi số lượng vi khuẩn trong mẫu thử bằng số MPN tìm được, thì kết quả là một trong số có khả năng thu được ít hơn cả số có khả năng xảy ra nhỏ nhất trong cấp hạng 1, nhưng tối đa chỉ có 1% khả năng thu được một kết quả có thể thấp hơn kết quả nhỏ nhất có thể xảy ra ở cấp hạng này.</p>
3	<p>Khi số lượng vi khuẩn trong mẫu thử bằng số MPN tìm được, thì kết quả là một trong số có khả năng thu được ít hơn cả giá trị nhỏ nhất trong cấp hạng 2, nhưng tối đa chỉ có 0,1% khả năng thu được kết quả có thể thấp hơn giá trị nhỏ nhất ở cấp hạng này.</p>
0	<p>Khi số lượng vi khuẩn trong mẫu thử bằng số MPN tìm được, thì kết quả là một trong số có khả năng thu được ít hơn cả giá trị nhỏ nhất trong cấp hạng 3, chỉ có 0,1% khả năng thu được một kết quả ở cấp hạng này, nếu như không có một sai sót nào.</p>

Cảnh báo - Giới hạn tin cậy cho trong bảng A.1 chỉ là giá trị trung bình nhằm cung cấp một số ý tưởng về ảnh hưởng của sai lệch thống kê đối với các kết quả. Ngoài ra, còn có những nguồn sai lệch khác mà đôi khi còn quan trọng hơn.