

**TCVN 7715-3:2013
ISO/TS 10272-3:2010**

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 3: PHƯƠNG PHÁP BÁN ĐỊNH LƯỢNG**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs –
Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. –
Part 3: Semi-quantitative method*

Lời nói đầu

TCVN 7715-3:2013 hoàn toàn tương đương với ISO/TS 10272-3:2010 và Định chính kỹ thuật 1:2011;

TCVN 7715-3:2013 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.

Bộ TCVN 7715 (ISO 10272), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng Campylobacter spp.* bao gồm các phần sau:

- TCVN 7715-1:2007 (ISO 10272-1:2006), *Phần 1: Phương pháp phát hiện*;
- TCVN 7715-2:2007 (ISO 10272-2:2006), *Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc*;
- TCVN 7715-3:2013 (ISO/TS 10272-3:2010), *Phần 3: Phương pháp bán định lượng*.

Lời giới thiệu

Do tính đa dạng của thực phẩm và thức ăn chăn nuôi nên TCVN 7715 (ISO 10272) có thể không thích hợp đến từng chi tiết cho từng sản phẩm cụ thể và có thể sử dụng các phương pháp khác.

Tuy nhiên, cần cố gắng áp dụng TCVN 7715 (ISO 10272) khi có thể, mọi sửa đổi chỉ vì những lý do kỹ thuật.

Khi soát xét TCVN 7715 (ISO 10272) thì cần phải tính đến mọi thông tin liên quan đến phạm vi mà các phương pháp trong bộ tiêu chuẩn này phải tuân theo và các nguyên nhân gây sai lệch đối với 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. Hy vọng rằng khi các tiêu chuẩn quốc tế và/hoặc tiêu chuẩn quốc gia đó được soát xét thì chúng phải được sửa đổi để phù hợp với bộ tiêu chuẩn này, sao cho cuối cùng chỉ còn các sai lệch với các phương pháp 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 3: Phương pháp bán định lượng

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

Part 3: Semi-quantitative method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp bán định lượng để xác định *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. Tuy nhiên tiêu chuẩn này có thể không thích hợp đến từng chi tiết cho từng sản phẩm cụ thể, các sai lệch so với tiêu chuẩn này chỉ vì các lý do kỹ thuật. Tiêu chuẩn này có thể không áp dụng được cho một số các sản phẩm khác.

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 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 8128-1 (ISO/TS 11133-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và sản xuất môi trường nuôi cấy – Phần 1: Hướng dẫn chung về đảm bảo chất lượng đối với việc chuẩn bị môi trường nuôi cấy trong phòng thử nghiệm*

TCVN 8128-2:2009 (ISO/TS 11133-2:2003), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và sản xuất môi trường nuôi cấy – Phần 2: Các hướng dẫn thực hành về thử hiệu năng của môi trường nuôi 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*)**

(vi sinh vật *Campylobacter* trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi) Chi 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 nhưng không phát triển ở 25 °C, có khả năng 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 *C. coli*. Tuy nhiên, các loài khác cũng đã được mô tả (*C. lari*, *C. upsaliensis* và một số loài khác).

3.2

Xác định bán định lượng (semi-quantitative determination)

(vi sinh vật *Campylobacter* trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi) Xác định mức độ nhiễm *Campylobacter*, khi số đếm dự kiến thấp hoặc khi quần thể vi khuẩn kèm theo ở mức tương đối cao.

4 Nguyên tắc

4.1 Yêu cầu chung

Phương pháp bán định lượng *Campylobacter* spp. Yêu cầu các bước từ 4.2 đến 4.4 (xem Hình A.1).

4.2 Tăng sinh trong môi trường lỏng chọn lọc

Phần mẫu thử và các dung dịch pha loãng thập phân được cấy hoặc được pha loãng trong môi trường tăng sinh lỏng (canh thang Bolton) và trộn đều.

Đem ủ môi trường tăng sinh ở 37 °C trong khoảng từ 4 h đến 6 h, 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 môi trường đặc chọn lọc thạch deoxycholat xefoperazon than cải biến (thạch mCCD), 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 giả định là *Campylobacter* spp. theo các đặc trưng của chúng.

4.4 Khẳng định

Các khuẩn lạc *Campylobacter* spp. giả định được cấy truyền lên thạch huyết Columbia không chọn lọc và khẳng định bằng các phép kiểm tra kính hiển vi, phép thử sinh hóa và phát triển thích hợp. *Campylobacter* spp. Có thể được nhận biết bằng các phép thử sinh hóa đặc trưng hoặc bằng các phép thử độ nhạy kháng sinh.

5 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

5.1 Yêu cầu chung

Về thực hành trong phòng thử nghiệm, xem TCVN 6404 (ISO 7218), TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-1) và TCVN 8128-2 (ISO/TS 11133-2).

CHÚ THÍCH Vi trong tiêu chuẩn sử dụng nhiều môi trường nuôi cấy và thuốc thử, và để cho nội dung tiêu chuẩn được ngắn gọn nên các 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 lông: canh thang Bolton, xem B.1.

5.3 Môi trường đổ đĩa chọn lọc: thạch deoxycholat xefoperazon than cải biến (thạch mCCD), xem B.2.

5.4 Thuốc thử và môi trường nhận dạng và khẳng 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 oxidase, xem B.5.

5.4.4 Dung dịch hydro peroxit, 3 % (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 và các đĩa cephalotin. Mỗi loại đĩa chứa 30 µg thuốc thử.

5.4.8 Đĩa indoxyl axetat, xem B.8.

6 Thiết bị, dụng cụ

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, buồng có dòng khí thổi hoặc tủ ẩm, có khả năng hoạt động ở nhiệt độ từ 37 °C đến 55 °C.

6.3 Tủ ẩm, có khả năng duy trì ở nhiệt độ 25 °C ± 1 °C; 37 °C ± 1 °C và 41,5 °C ± 1 °C.

6.4 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì nhiệt độ ở 37 °C ± 1 °C.

6.5 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì 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, cụ thể là các ống nghiệm 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 xà hết, dung tích danh nghĩa 1 ml và 10 ml được chia độ đến 0,1 ml, phù hợp với loại A nêu trong TCVN 7150 (ISO 835)^[1] và pipet Pasteur, phù hợp với TCVN 7152 (ISO 7712)^[2].

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

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

Vòng bằng hợp kim niken/crom là không thích hợp để sử dụng trong phép thử oxidase (xem 9.5.6).

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* spp.).

6.14 Thiết bị thích hợp để thu được môi trường vi hiếu khí với các thể tích của oxi là 5 % ± 2 %, cacbon dioxide 10 % ± 3 %, hydro ≤ 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 chính xác hướng dẫn của nhà sản xuất, 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 khác để ủ trong môi trường vi hiếu khí, là canh thang tăng sinh có thể được ủ trong chai đựng có nắp vặn, trong bình cầu hoặc trong ống nghiệm đựng canh thang tăng sinh, có khoảng trống phía trên nhỏ hơn 20 mm và có nắp vặn kín khí.

7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc bị biến đổi trong suốt quá trình vận chuyển và bảo quản.

Việc lấy mẫu không quy 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.

Vi *Campylobacter* spp. rất nhạy với nhiệt độ đông lạnh nhưng lại tồn tại rất tốt ở nhiệt độ thấp, nên các mẫu thử cần được bảo quản ở $+3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ và nên phân tích càng nhanh càng tốt. Chú ý để không làm mẫu khô.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo phần có liên quan của TCVN 6507 (ISO 6887) đối với sản phẩm cụ thể. Nếu tiêu chuẩn này không thích hợp thì các bên có liên quan nên thoả thuận với nhau về vấn đề này.

9 Cách tiến hành

9.1 Yêu cầu chung

Xem Sơ đồ A.1.

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

9.2.1 Từ mẫu thử (Điều 8) lấy phần mẫu thử x g hoặc x ml (tối thiểu là 15 g hoặc 15 ml) cho vào canh thang Bolton môi trường tăng sinh (5.2) với thể tích lớn gấp tám lần (tối thiểu 120 ml) và đồng hóa để thu được huyền phù ban đầu.

9.2.2 Chuyển một lượng 90 ml huyền phù ban đầu (9.2.1) vào chai 100 ml. Phần này tương ứng với 10 g phần mẫu thử. Khi đọc kết quả, dung dịch này tương ứng với 10^1 .

9.2.3 Chuyển 10 ml huyền phù ban đầu (9.2.1) vào ống cấy. Khi đọc kết quả, dung dịch này tương ứng với 10^0 . Sau bước pha loãng tiếp theo (9.2.4), giữ lại 9 ml dung dịch này. Phần này tương ứng với 1 g phần mẫu thử.

9.2.4 Chuẩn bị các dãy dung dịch pha loãng thập phân (ví dụ đến 10^{-4}) từ dung dịch pha loãng 10^0 (9.2.3) bằng cách chuyển 1,0 ml sang các ống nghiệm chứa 9,0 ml canh thang Bolton. Lượng 1,0 ml từ dung dịch pha loãng cao nhất bị loại bỏ, vì tất cả các ống nghiệm phải chứa 9,0 ml. Khi đọc kết quả, các dung dịch này tương ứng với 10^{-1} , 10^{-2} ...

9.3 Tăng sinh

Ủ các phần mẫu thử và các dung dịch pha loãng (9.2.2, 9.2.3 và 9.2.4) trong môi trường vi hiếu khí (6.14) ở 37 °C trong khoảng từ 4 h đến 6 h, rồi ủ tiếp ở 41,5 °C trong 44 h ± 4 h.

9.4 Phân lập

9.4.1 Lấy vòng cấy vô trùng (6.11) cấy một vòng dịch cấy thu được trong môi trường tăng sinh (9.3) lên bề mặt các đĩa thạch mCCD môi trường phân lập chọn lọc (5.3).

9.4.2 Ủ các đĩa (9.4.1) ở 41,5 °C trong môi trường vi hiếu khí (6.14).

9.4.3 Sau khi ủ trong 44 h ± 4 h, kiểm tra các đĩa về các khuẩn lạc điển hình và/hoặc các khuẩn lạc nghi ngờ của *Campylobacter* spp.

Các khuẩn lạc điển hình có màu xám trên thạch mCCD, thường có lớp 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.

9.5 Khẳng định *Campylobacter* spp.

9.5.1 Yêu cầu chung

Vì vi khuẩn suy giảm rất nhanh trong không khí, do đó các quy trình mô tả trong 9.5.2 đến 9.5.6 cần được thực hiện ngay.

9.5.2 Chọn các khuẩn lạc để khẳng định

9.5.2.1 Để khẳng định, từ mỗi đĩa của mỗi môi trường chọn lọc (9.4.3) lấy ít nhất một khuẩn lạc được coi là *Campylobacter* spp. điển hình hoặc nghi ngờ, kiểm tra hình thái và tính di động bằng kính hiển vi (9.5.3.1) và thực hiện cùng một cách với bốn khuẩn lạc nữa nếu khuẩn lạc thứ nhất là âm tính.

9.5.2.2 Cấy rìa 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 và khả năng phát triển trong điều kiện vi hiếu khí ở 25 °C, mọc trong điều kiện hiếu khí ở 41,5 °C và sự có mặt của oxidase.

9.5.3 Kiểm tra hình thái và tính di động

9.5.3.1 Hòa một khuẩn lạc từ đĩa thạch huyết Columbia (9.5.2.2) vào 1 ml canh thang Brucella (5.4.2) hoặc dung dịch muối pepton và kiểm tra về hình thái và tính di động bằng kính hiển vi (6.13).

9.5.3.2 Giữ tất cả các khuẩn lạc (9.5.2.2) để kiểm tra tiếp theo trong đó các trục khuẩn uốn cong có di động xoay "xoắn ốc" được tìm thấy (9.5.3.1).

9.5.4 Nghiên cứu sự phát triển ở 25 °C (vi hiếu khí)

Sử dụng vòng cấy (6.11) lấy các khuẩn lạc đã phân lập trong 9.5.2.2, 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* spp.

9.5.5 Nghiên cứu sự phát triển ở 41,5 °C (hiếu khí)

Sử dụng một vòng cấy (6.11) lấy các khuẩn lạc đã phân lập trong 9.5.2.2, cấy lên bề mặt đĩa thạch huyết Columbia (5.4.1).

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

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

9.5.6 Phát hiện oxidase

Dùng vòng cấy hoặc que cấy bằng platin/iridi, que cấy bằng chất dẻo hoặc đũa thủy tinh (6.11), lấy một phần của mỗi khuẩn lạc được tách biệt rõ (9.5.2.2) từ mỗi đĩa và ria cấy lên giấy lọc đã được làm ẩm bằng thuốc thử oxidase (5.4.3); 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 oxidase 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).

9.5.7 Diễn giải kết quả

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

Bảng 1 – Các đặc trưng của *Campylobacter*

Hình thái học (9.5.3)	trực khuẩn uốn cong nhỏ
Tính di động (9.5.3)	đặc trưng
Mọc trong điều kiện vi hiếu khí ở 25 °C (9.5.4)	–
Mọc trong điều kiện hiếu khí ở 41,5 °C (9.5.5)	–
Oxidase (9.5.6)	+

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

9.6 Nhận biết *Campylobacter* spp. (tùy chọn)

9.6.1 Yêu cầu chung

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

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>
Catalase (9.6.2)	+	+	+	– hoặc nhẹ
Axit nalidixic (9.6.3)	S ^a	S ^a	R/S ^b	S
Cephalotin (9.6.3)	R	R	R	S
Thủy phân hipurat (9.6.4)	+ ^c	–	–	–
Indoxyl axetat (9.6.5)	+	+	–	+

Chú dẫn: + là dương tính; S là nhạy; R là bền và – là âm tính.

^a Cho thấy tăng bền với axit nalidixic của các chủng *C. jejuni* và *C. coli*.

^b Tồn tại các chủng *C. lari* vừa nhạy vừa bền.

^c Tồn tại các chủng *C. jejuni* âm tính với hipurat.

9.6.2 Phát hiện catalase

Đối với mỗi khuẩn lạc được chọn trong 9.5.2.2, 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).

9.6.3 Phát hiện độ nhạy với axit nalidixic và cephalotin

Dùng vòng cấy (6.11) lấy từng khuẩn lạc được chọn trong 9.5.2.2 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 % thể tích (5.4.6).

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

Sấy khô đĩa 10 min trong tủ sấy (6.2) duy trì ở 37 °C trong 10 min.

Đặt đĩa axit nalidixic và đĩa cephalotin (5.4.7) lên mặt 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 như sau:

- phát triển trong vùng tiếp xúc với đĩa được phân loại là bền với axit nalidixic và cephalotin;
- có mặt một vùng ức chế với mọi kích cỡ được phân loại là nhạy cảm với axit nalidixic và cephalotin.

9.6.4 Phát hiện thủy phân hipurat

Đối với mỗi khuẩn lạc được chọn trong 9.5.2.2, sử dụng vòng cấy (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 4 h trong tủ ấm 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) ở 37 °C 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 *C. jejuni* NCTC 11351 (kiểm chứng dương tính), *C. coli* NCTC 11366 (kiểm chứng âm tính).

9.6.5 Phát hiện thủy phân indoxyl axetat

Cho một khuẩn lạc được chọn trong 9.5.2.2 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 *C. jejuni* NCTC 11351 (kiểm chứng dương tính), *C. lari* NCTC 11352 (kiểm chứng âm tính).

9.6.6 Diễn giải

Campylobacter spp. phát triển ở 41,5 °C có thể được nhận biết ở mức loài dựa vào Bảng 2.

10 Tính và biểu thị kết quả

10.1 Phương pháp tính

Phương pháp bán định lượng được dựa vào phát hiện định tính trong các dung dịch pha loãng được chọn. Do đó các kết quả được cho trong các khoảng theo Bảng 3.

Sử dụng phương pháp phân bố Poison để ước tính dải nồng độ phù hợp với các kết quả. Ví dụ : nếu nồng độ đúng là 0,005 cfu/g thì có 5 % cơ hội tìm thấy kết quả dương tính đối với độ pha loãng 10^1 . Nếu nồng độ đúng là 3 cfu/g thì có 95 % cơ hội tìm thấy kết quả dương tính đối với độ pha loãng 10^0 . Do đó, nếu kết quả dương tính quan sát được đối với độ pha loãng 10^0 và 10^1 và các độ pha loãng cao hơn là âm tính thì nồng độ đúng có khả năng nằm trong khoảng từ 0,005 cfu/g đến 3 cfu/g.

Bảng 3 – Các khoảng kết quả đối với các dãy pha loãng

Khối lượng g	Sự phát triển của <i>Campylobacter</i> spp. được khẳng định						
	-	+	+	+	+	+	+
10^1	-	+	+	+	+	+	+
10^0	-	-	+	+	+	+	+
10^{-1}	-	-	-	+	+	+	+
10^{-2}	-	-	-	-	+	+	+
10^{-3}	-	-	-	-	-	+	+
10^{-4}	-	-	-	-	-	-	+
MPN/g	0	0,23	2,3	23	230	2 400	∞
T_0	0	0,019	0,19	1,9	19	190	580
T_1	0,33	2,7	27	270	2 700	30 000	∞

Nếu tất cả các phép thử là âm tính, kết quả phải được ghi là MPN = 0/g (giới hạn tin cậy trên, T_1 0,33/g); nếu tất cả các phép thử là dương tính thì các kết quả phải được ghi là MPN = ∞ (giới hạn tin cậy dưới, T_0 580/g).

10.2 Độ chụm

Một nghiên cứu cộng tác quốc tế đã tổ chức năm 2005 do Ủy ban phân tích Thực phẩm Bắc Âu (NMKL) thực hiện phép xác định bán định lượng *Campylobacter* spp. theo tiêu chuẩn này. Nghiên cứu này gồm có 14 phòng thử nghiệm tham gia và tiến hành trên thịt gà nguyên liệu và sữa. Các mẫu thực phẩm đã được thử nghiệm ở các mức nhiễm khác nhau, cộng với kiểm soát âm tính. Độ nhạy của phương pháp bán định lượng là 100 %. Độ nhạy tổng thể của phương pháp là 82,1 %. Độ nhạy để phát hiện *Campylobacter* spp. trong sữa thấp hơn đối với thịt gà. Hiệu quả định lượng của phương pháp đối với *Campylobacter* spp. trong thịt gà quan sát được trong nghiên cứu công tác này phù hợp với dải nồng độ nêu trong Bảng 3.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- b) phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- c) môi trường tăng sinh lỏng đã sử dụng;
- d) môi trường phân lập đã sử dụng;
- e) nhiệt độ ủ đã chọn;
- f) các kết quả thử nghiệm thu được;
- g) mọi chi tiết không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy chọn, cũng như mọi chi tiết bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- h) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.

Phụ lục A

(Quy định)

Sơ đồ quy trình

Huyền phù ban đầu

Phần mẫu thử

$x (\geq 15 \text{ g}) + 8 \text{ lần } x (\geq 120 \text{ ml})$ canh thang Bolton

độ pha loãng 10^1
90 ml chứa 10 g
phần mẫu thử

90 ml huyền phù ban đầu

10 ml huyền phù ban đầu

độ pha loãng 10^0
9 ml chứa 1 g
phần mẫu thử

1 ml $10^0 + 9$ ml canh thang Bolton

độ pha loãng 10^{-1}
9 ml chứa 0,1 g
phần mẫu thử

1 ml $10^{-1} + 9$ ml canh thang Bolton

độ pha loãng 10^{-2}
9 ml chứa 0,01 g
phần mẫu thử

tiếp theo, ví dụ đến 10^{-4}

Tăng sinh

Ủ trong môi trường vi hiếu khí
ở 37°C trong 4 h đến 6 h
sau đó ở $41,5^\circ\text{C}$ trong (44 ± 4) h

Phân lập

Thạch mCCD (5.3)

Ủ trong môi trường vi hiếu khí
ở $41,5^\circ\text{C}$ trong (44 ± 4) h

Các khuẩn lạc đặc trưng (9.4.1)

**Khẳng định
và nhận biết**

Khẳng định (9.5.2 đến 9.5.4)
Nhận biết (tùy chọn) (9.6)

Biểu thị kết quả (Điều 10)

Hình A.1 – Sơ đồ quy trình

Phụ lục B

(Quy 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**

Sản phẩm thủy phân mô động vật bằng enzym	10,0 g
Lactalbumin hydrolysat	5,0 g
Chất chiết nấm 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 α -ketoglutaric	1,0 g
Haemin (được hòa tan trong natri hydroxit 0,1 % khối lượng)	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. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH của môi trường hoàn chỉnh là $7,4 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần. Phân phối môi trường cơ bản vào các bình cầu có dung tích thích hợp. Khử trùng môi trường 15 min ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 Thành phần 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
Hỗn hợp etanol và nước cất: 1 + 1 (thể tích)	5 ml

B.1.4 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong hỗn hợp của etanol và nước cất tỷ lệ 1:1.

B.1.5 Môi trường hoàn chỉnh**B.1.5.1 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.1.5.2 Chuẩn bị

Bổ sung huyết một cách vô trùng vào môi trường cơ bản ở nhiệt độ dưới 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 9.2.2) 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 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.1.6 Thử hiệu năng

Thử hiệu năng của canh thang Bolton (B.1.5.1) theo các phương pháp và các tiêu chí trong TCVN 8128-2 (ISO/TS 11133-2). Các ví dụ về các chủng kiểm chứng thích hợp là *C. jejuni* NCTC 11351 hoặc ATCC 33291 với các tiêu chí sau: > 10 khuẩn lạc trên thạch mCCD (5.3) sau khi ủ vi hiếu khí ở 41,5 °C trong 44 h ± 4 h.

B.2 Thạch deoxycolat xefoperazon than cải biến (mCCD)**B.2.1 Môi trường cơ bản****B.2.1.1 Thành phần**

Chất chiết từ thịt	10,0 g
Sản phẩm thủy phân mô động vật bằng enzym	10,0 g
Natri clorua	5,0 g
Than củi	4,0 g
Dịch thủy 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 vào độ đông của thạch.

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
Amphotericin	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.2.2)	5 ml

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 trộn sau đó trộn 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 °C ± 2 °C thì không quá 7 ngày.

B.2.4 Thử hiệu năng

Đối với việc xác định tính chọn lọc và hiệu quả, xem TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-1). Đối với các tiêu chí thực hiện, xem Bảng B.5 của TCVN 8128-2:2009 (ISO/TS 11133-2:2003).

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

Sản phẩm 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 ^a
Nước	1 000 ml
^a Tùy vào độ đông của thạch.	

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 ± 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

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 sau đó trộn. 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 min 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**

Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym	10,0 g
Sản phẩm thủy phân mô động vật bằng enzym	10,0 g
Glucose	1,0 g
Chất chiết nấm 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 oxidase**B.5.1 Thành phần**

<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametyl-1,4-phenylenediamin dihydro clorua	1,0 g
Nước	100 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	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**

Sản phẩm thủy phân mô động vật bằng enzym	6,0 g
Sản phẩm 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 ^a
Nước	1 000 ml

^a Tùy thuộc vào độ đông của thạch.

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°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°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 nhiệt độ trong khoảng từ 47°C đến 50°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 $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 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 từ 25 μ l đến 50 μ l dung dịch này vào các đĩa giấy trắng (đường kính đĩa từ 6 mm đến 12 mm). Sau khi để khô ở nhiệt độ phòng, bảo quản các đĩa này ở $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong ống nghiệm hoặc chai màu nâu có chứa silica gel.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 7150 (ISO 835) *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet chia độ*
 - [2] TCVN 7152 (ISO 7712) *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet Pasteur sử dụng một lần*
 - [3] NKML Method No. 119, *Thermotolerant Campylobacter – Detection, semi-quantitative and quantitative determination in foods and drinking water*. Available (2009-06-09) from: <http://shop.nmkl.org>
 - [4] BAYLIS, C.L., MACPHEE, S., MARTIN, K.W., HUMPHREY, T.J., BETTS, R.P. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. From foods. *J. Appl. Microbiol.* 2000, **89**, pp.884-891
 - [5] BOLTON, F.J., HUTCHINSON, D.N., COATES, D. Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *J.Clin. Microbiol.* 1984, **19**, pp.169-171
 - [6] BOLTON, F.J., SAILS, A.D., Fox, A.J., WAREING, D.R., GREENWAY, D.L. 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
 - [7] CORRY, J.E.I., CURTIS, G.D.W., BAIRD, R.IV., editors. *Handbook of culture media for food microbiology*. Elsevier. Amsterdam, 2003 (*Progress in industrial microbiology*, Vol. 37)
 - [8] HUTCHINSON, D.N., BONTOL, F.J. Improved blood free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. *J. Clin. Pathol.* 1984, **37**, pp. 956-957
 - [9] JOSEFSEN, M.H., LÜBECK, P.S., AALBAEK, B., HOORFAR, J. Preston and Park-Sanders protocols adapted for semi-quantitative isolation of thermotolerant *Campylobacter* from chicken rinse. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, **80**, pp. 177-183
 - [10] ROSENQUIST, H. BENGTTSSON, A., HANSEN, T.B. A collaborative study on a Nordic standard protocol for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* in food (NMKL 119, 3. Ed., 2007). *Int. J. Food Microbiol.* 2007, **118**, pp. 201-213
-