

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 6404:2008

ISO 7218:2007

Xuất bản lần 3

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ
THỨC ĂN CHĂN NUÔI – YÊU CẦU CHUNG
VÀ HƯỚNG DẪN KIỂM TRA VI SINH VẬT**

Microbiology of food and animal feeding stuffs –

General requirements and guidance for microbiological examinations

HÀ NỘI - 2008

Lời nói đầu

TCVN 6404:2008 thay thế TCVN 6404:2007;

TCVN 6404:2008 hoàn toàn tương đương với ISO 7218:2007;

TCVN 6404:2008 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13
Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn
Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật

*Microbiology of food and animal feeding stuffs –
General requirements and guidance for microbiological examinations*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra các yêu cầu chung và các hướng dẫn/lựa chọn cho ba mục đích sử dụng chính sau đây:

- áp dụng các tiêu chuẩn của các Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia có liên quan để phát hiện hoặc định lượng vi sinh vật, sau đây được gọi là "các tiêu chuẩn cụ thể";
- thực hành phòng thử nghiệm tốt đối với các phòng thử nghiệm vi sinh vật trong thực phẩm (có sẵn các tài liệu cho mục đích này nhưng không nêu chi tiết chúng trong tiêu chuẩn này);
- hướng dẫn công nhận các phòng thử nghiệm vi sinh trong thực phẩm (tiêu chuẩn này mô tả các yêu cầu kỹ thuật theo Phụ lục B của TCVN ISO/IEC 17025 về công nhận phòng thử nghiệm vi sinh bởi các tổ chức quốc gia).

Các yêu cầu của tiêu chuẩn này thay thế các yêu cầu tương ứng của các tiêu chuẩn cụ thể hiện hành.

Các hướng dẫn bổ sung trong lĩnh vực kiểm tra sinh học phân tử được quy định trong ISO 22174.

Tiêu chuẩn này bao gồm việc kiểm tra vi khuẩn, nấm men và nấm mốc và có thể được sử dụng nếu được bổ sung hướng dẫn cụ thể về prion (các phần tử lây nhiễm có protein), ký sinh trùng và virus. Tiêu chuẩn này không bao gồm việc kiểm tra các độc tố hoặc các chất chuyển hoá khác (ví dụ: các amin) từ vi sinh vật.

TCVN 6404:2008

Tiêu chuẩn này áp dụng cho vi sinh vật trong thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và môi trường sản xuất thực phẩm và môi trường sản xuất ban đầu.

Mục đích của tiêu chuẩn này là giúp đảm bảo tính hợp thức của công việc kiểm tra nhằm xác định tính đồng nhất của các kỹ thuật chung sử dụng trong kiểm tra ở tất cả các phòng thử nghiệm, giúp đạt được các kết quả đồng nhất tại các phòng thử nghiệm khác nhau và bảo vệ sức khoẻ của nhân viên phòng thử nghiệm bằng cách ngăn ngừa các nguy cơ truyền nhiễm.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là 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.

TCVN 7150 (ISO 835) (tất cả các phần), Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet chia độ.

TCVN 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần), Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung về việc chuẩn bị các dung dịch pha loãng để 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 dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật.

ISO 8199, Water quality – General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture (Chất lượng nước – Hướng dẫn chung về định lượng vi sinh vật bằng cách nuôi cấy).

ISO 8655-1, Piston-operated volumetric apparatus – Part 1: Terminology, general requirements and user recommendations (Dụng cụ pittong định mức – Phần 1: Thuật ngữ, yêu cầu chung và khuyến cáo sử dụng).

ISO/TS 11133 (tất cả các phần), Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị môi trường nuôi cấy).

ISO 16140, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for validation of alternative methods (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Quy trình đánh giá các phương pháp thay thế).

ISO/TS 19036, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn đánh giá độ không đảm bảo đo đối với phép định lượng).

ISO 22174, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) để phát hiện các sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Yêu cầu chung và định nghĩa).

3 Cơ sở thử nghiệm

3.1 Yêu cầu chung

Điều này đưa ra các yêu cầu chung, ví dụ: các nguyên tắc thiết kế và tổ chức để thực hiện của phòng thử nghiệm vi sinh.

Việc kiểm tra các mẫu giai đoạn trong sản xuất ban đầu (đặc biệt đối với việc tiếp nhận mẫu và chuẩn bị mẫu) phải được tách riêng khỏi khu vực kiểm tra các mẫu khác để giảm nguy cơ nhiễm bẩn chéo.

3.2 Các vấn đề về an toàn

Thiết kế phòng thử nghiệm phải tuân thủ các yêu cầu về an toàn tùy thuộc vào từng loài vi sinh vật. Các vi sinh vật được phân thành bốn cấp nguy cơ sau đây:

- **Nguy cơ cấp 1** (không có hoặc có nguy cơ rất thấp đối với cá thể và cộng đồng).

Vi sinh vật không gây bệnh cho người hoặc động vật.

- **Nguy cơ cấp 2** (nguy cơ vừa phải đối với cá thể, nguy cơ thấp đối với cộng đồng)

Nguồn bệnh có thể gây bệnh cho người hoặc động vật nhưng không tạo mối nguy cho nhân viên phòng thử nghiệm, cộng đồng hoặc môi trường. Phòng thử nghiệm phơi nhiễm có thể làm lây nhiễm nghiêm trọng tới con người, nhưng việc xử lý có hiệu quả và các biện pháp phòng ngừa là có sẵn và nguy cơ phát tán sự lây nhiễm là hạn chế.

- **Nguy cơ cấp 3** (nguy cơ cao đối với cá thể, nguy cơ thấp đối với cộng đồng)

Nguồn bệnh thường gây bệnh cho người hoặc động vật nhưng không phát tán từ người này sang người khác. Việc xử lý có hiệu quả và các biện pháp phòng ngừa là có sẵn.

- **Nguy cơ cấp 4** (nguy cơ cao đối với cá thể và đối với cộng đồng)

Nguồn bệnh thường lây nhiễm sang người hoặc động vật và có thể tiếp hoặc gián tiếp phát tán dễ dàng từ người này sang người khác trực. Thường không có sẵn các biện pháp xử lý có hiệu quả và các biện pháp phòng ngừa thích hợp.

CẢNH BÁO – Tham khảo các quy định quốc gia để xác định cấp nguy cơ đối với vi sinh vật.

3.3 Thiết kế phòng thử nghiệm

Các hướng dẫn đối với phòng thử nghiệm mô tả dưới đây bao gồm việc kiểm tra để phát hiện vi sinh vật thuộc nguy cơ cấp 1, 2 và 3 đối với vi sinh vật trong thực phẩm.

Trong qui định nội bộ có thể có thêm các qui định về biện pháp an toàn.

3.4 Khu vực thử nghiệm

3.4.1 Yêu cầu chung

Phòng thử nghiệm gồm có các khu vực lấy mẫu và thử nghiệm (xem 3.4.2) và các khu vực chung (xem 3.4.3). Các khu vực này phải tách biệt nhau.

3.4.2 Khu vực lấy mẫu và thử nghiệm

Phòng thử nghiệm thực hành tốt cần có các khu vực tách biệt hoặc các khu vực được khoanh vùng riêng sau đây:

- nơi nhận và bảo quản mẫu,
- nơi chuẩn bị mẫu, đặc biệt là trường hợp mẫu nguyên liệu (ví dụ: các sản phẩm dạng bột chứa lượng vi sinh vật cao);
- kiểm tra mẫu (từ mẫu huyền phù ban đầu), gồm cả việc ủ vi sinh vật.
- thao tác với vi sinh vật gây bệnh giả định;
- bảo quản chủng đối chứng và các chủng khác;
- chuẩn bị và khử trùng môi trường nuôi cấy và dụng cụ;
- bảo quản môi trường nuôi cấy và thuốc thử;
- kiểm tra độ vô trùng của thực phẩm;
- khử nhiễm;
- làm sạch dụng cụ thủy tinh và các dụng cụ khác;
- bảo quản hoá chất độc hại, tốt nhất là giữ trong tủ, hộp, phòng hoặc kho chuyên dụng.

3.4.3 Khu vực chung

Các khu vực thuộc phạm trù này bao gồm:

- lối vào, hành lang, cầu thang, thang máy;
- khu vực hành chính (ví dụ như: phòng thư ký, văn phòng, phòng tài liệu ...);
- phòng thay áo và nhà vệ sinh;
- phòng văn thư lưu trữ;
- nhà kho;
- phòng nghỉ.

3.5 Bố trí và lắp đặt nhà xưởng

3.5.1 Mục tiêu

Mục tiêu là để đảm bảo rằng môi trường mà ở đó tiến hành phân tích vi sinh vật không được ảnh hưởng đến độ tin cậy của phép phân tích.

Phải chú ý tới vị trí của cơ sở thử nghiệm sao cho tránh nguy cơ tạp nhiễm chéo. Các cách để đạt được mục tiêu đó là:

- a) xây dựng phòng thử nghiệm theo nguyên tắc "đường một chiều";
- b) thực hiện các quy trình theo phương thức liên tiếp với các phòng ngừa thích hợp để đảm bảo phép thử và độ nguyên vẹn của mẫu (ví dụ: sử dụng các hộp chứa được hàn kín);
- c) tách riêng các hoạt động theo thời gian hoặc không gian;

Tránh các điều kiện vượt quá sự cho phép như: nhiệt độ, bụi, độ ẩm, hơi nước, tiếng ồn, độ rung v.v...

Mặt bằng khu vực phải đủ rộng để giữ được vệ sinh và ngăn nắp. Cần có không gian tương xứng với khối lượng phân tích, xử lý và tổ chức bên trong của phòng thử nghiệm. Không gian đó cần theo qui định của quốc gia, khi có.

3.5.2 Lắp đặt

Cơ sở thử nghiệm phải được thiết kế và trang bị để giảm bớt nguy cơ nhiễm bẩn do bụi kéo theo vi sinh vật (đối với các vi sinh vật nguy cơ cấp 3, xem quy định của quốc gia) như sau:

TCVN 6404:2008

- a) tường, trần và sàn nhà phải nhẵn, dễ rửa và chịu được các chất tẩy rửa và các chất khử trùng dùng trong phòng thử nghiệm.
- b) sàn nhà không được trơn.
- c) không để các đường ống dẫn chất lỏng trên mặt đất đi ngang qua cơ sở thử nghiệm trừ khi chúng được bọc kín. Mọi cấu trúc nổi phía trên cần được bọc kín hoặc dễ làm vệ sinh định kỳ.
- d) các cửa ra vào và cửa sổ cần được đóng kín khi đang tiến hành thử để ngăn gió lùa. Ngoài ra, chúng phải được thiết kế sao cho chống được bụi bám và dễ lau rửa. Nhiệt độ môi trường xung quanh (18 °C đến 27 °C) và chất lượng không khí (mật độ vi sinh vật, tốc độ phát tán bụi .v.v..) cần tương thích với việc thực hiện các phép thử. Để thực hiện điều này nên dùng hệ thống lọc không khí đi vào và đi ra.
- e) lắp hệ thống bảo vệ khỏi bụi từ khu vực xử lý môi trường nuôi cấy khô, mẫu dạng bụi hoặc dạng bột.
- f) khi phép thử được tiến hành trong môi trường ít bị nhiễm bẩn, thì phòng thử nghiệm phải được trang bị đặc biệt, với một tủ cấy thổi không khí sạch và /hoặc một tủ an toàn.
- g) môi trường phòng thử nghiệm cần được bảo vệ chống bức xạ mặt trời ở phía ngoài bằng cách sử dụng các cửa chớp hoặc các tấm thủy tinh đã xử lý thích hợp. Không nên sử dụng các rèm che phía trong vì khó làm vệ sinh và trở thành nguồn tích bụi.

3.5.3 Các điểm khác

Các điểm khác cần được xem xét là:

- nguồn nước, chất lượng nước thích hợp cho mục đích sử dụng;
- nguồn điện.
- khí đốt (đường ống hoặc bình).
- ánh sáng đầy đủ trong mọi bộ phận của phòng thử nghiệm;
- mặt bàn và các trang bị của phòng thử nghiệm phải được chế tạo bằng vật liệu nhẵn trơn, không thấm, dễ làm sạch và khử trùng;
- các trang thiết bị của phòng thử nghiệm phải được thiết kế sao để thuận tiện cho việc lau rửa sàn nhà (ví dụ, các trang thiết bị thử nghiệm có thể di chuyển được).
- các trang thiết bị, các tài liệu không sử dụng thường xuyên không để trong khu vực thử nghiệm;
- tính sẵn có của các phương tiện bảo quản tài liệu để sử dụng khi thao tác với mẫu, môi trường nuôi cấy, hoá chất .v.v...

- cung cấp bồn rửa tay trong mỗi phòng thử nghiệm và các khu vực chung nếu cần, nên để gần cửa;
- tính sẵn có của dụng cụ hấp áp lực để khử nhiễm môi trường nuôi cấy và vật liệu thải, trừ khi có sẵn có hệ thống loại bỏ vật liệu thải thích hợp bằng cách đốt;
- các hệ thống an toàn phòng cháy, điện, thiết bị rửa mắt và vòi tắm hoa sen;
- thiết bị phụ trợ.

3.6 Làm sạch và khử trùng

Các điểm dưới đây cần phải được kiểm tra:

- Mặt sàn, tường, trần, mặt bàn và các trang thiết bị của phòng thử nghiệm phải được bảo dưỡng thường xuyên và sửa chữa để tránh nứt rạn dẫn đến bụi bẩn có thể tích tụ và gây ra nhiễm bẩn.
- Thường xuyên lau rửa và khử trùng để giữ cho các phòng luôn trong trạng thái thích hợp để tiến hành thử nghiệm. Các bề mặt bị nhiễm bẩn hoặc có khả năng nhiễm bẩn cần được khử nhiễm bằng chất tẩy rửa đã biết có tính diệt nấm và diệt khuẩn.

CHÚ THÍCH 1 Phòng và thiết bị có thể được khử nhiễm bằng cách xông bằng hơi formaldehyt, nếu luật cho phép.

- Hệ thống thông gió và các bộ lọc của chúng cần được bảo dưỡng thường xuyên và thay các bộ lọc khi cần.
- Cần kiểm tra số lượng vi sinh vật định kỳ trên các bề mặt làm việc của phòng thử nghiệm, nhân viên tiếp xúc với các bề mặt và không khí cần được kiểm tra định kỳ (tần số phụ thuộc vào các kết quả thử nghiệm trước đó).
- Độ nhiễm bẩn bề mặt có thể được đánh giá bằng cách áp trực tiếp miếng lấy mẫu đã tẩm chất trung hoà thích hợp lên bề mặt (ví dụ: lexithin, natri thiosulfat). Chất lượng không khí có thể được kiểm tra bằng cách đặt một đĩa petri mở nắp có chứa môi trường thạch không chọn lọc (ví dụ: thạch đếm đĩa-PAC) hoặc thạch chọn lọc thích hợp cho sinh vật đích (ví dụ: nấm mốc) trong 15 min.

CHÚ THÍCH 2 Có thể dùng các phương pháp khác để xác định độ nhiễm bẩn bề mặt và không khí. Xem ISO 18593.

4 Nhân sự

4.1 Yêu cầu chung

Các yêu cầu chung về năng lực của nhân sự, xem TCVN ISO/IEC 17025.

TCVN 6404:2008

4.2 Năng lực

Đối với mỗi phương pháp hoặc mỗi kỹ thuật, các chuẩn mực phải được xác định để đánh giá năng lực thích hợp lúc ban đầu và khi tiến hành.

Năng lực có thể thiết lập trong phòng thử nghiệm bằng kiểm soát chất lượng nội bộ (xem 15.1.2).

CHÚ THÍCH Một trong những nguyên nhân gây sai lệch kết quả đếm khuẩn lạc (hút bằng pipet, độ không đồng nhất của huyền phù ban đầu, đếm .v.v...) khi định lượng khuẩn lạc bằng phương pháp đếm trong ISO 14461-1.

4.3 Kiểm tra năng lực thực hiện của nhân viên

Việc kiểm tra năng lực thực hiện của nhân viên cần được đánh giá định kỳ theo các thông số mục tiêu. Điều này bao gồm việc tham gia vào các chương trình đảm bảo chất lượng nội bộ, các thử nghiệm thành thạo [xem TCVN 7777-1 (ISO/IEC Guide 43-1)], sử dụng vật liệu chuẩn, hoặc các phép thử tự đánh giá về định lượng vi sinh vật như mô tả trong ISO 14461-2.

4.4 Vệ sinh

Về lĩnh vực vệ sinh cá nhân, phải tuân thủ các lưu ý sau đây để tránh làm nhiễm bẩn mẫu thử và môi trường nuôi cấy, đồng thời cũng để tránh nguy cơ lây nhiễm sang con người:

- a) Phải mặc áo choàng thử nghiệm sạch và trong trạng thái tốt, được sản xuất từ loại sợi hạn chế được nguy cơ cháy. Không mang áo choàng ra khỏi khu vực làm việc và phòng thay đồ.
- b) Mang trang bị bảo vệ tóc và râu, nếu cần.
- c) Giữ móng tay thật sạch, tốt nhất là cắt ngắn.
- d) Rửa tay sạch bằng nước ấm, tốt hơn nên rửa dưới vòi không điều khiển bằng tay trước và sau khi kiểm tra vi sinh vật và ngay sau khi đi vệ sinh. Sử dụng xà phòng nước hoặc xà phòng bột, hoặc nếu có thể bằng nước rửa sát trùng cấp từ dụng cụ phân phối ở trạng thái sạch. Lau khô tay bằng giấy hoặc bằng khăn tay sử dụng một lần. Những lưu ý này áp dụng cho cả nhân viên phòng thử nghiệm lẫn khách tham quan.
- e) Khi tiếp xúc với mẫu trần, dịch cấy, môi trường và khi nuôi cấy mẫu không nói chuyện, ho, v.v...
- f) Đặc biệt lưu ý khi người bị nhiễm trùng da hoặc đang bị ốm có thể gây nhiễm sang mẫu thử và có thể làm sai lệch kết quả.
- g) Không ăn hoặc uống trong các khu vực thử nghiệm và không để thức ăn của nhân viên trong các tủ lạnh hoặc tủ lạnh đông khi tủ đựng đồ thử nghiệm.
- h) Không dùng miệng để hút pipet.

5 Thiết bị và dụng cụ

5.1 Yêu cầu chung

Theo thực hành phòng thử nghiệm tốt thì tất cả các thiết bị, dụng cụ phải được giữ sạch và luôn ở trạng thái tốt. Trước khi sử dụng, dụng cụ phải được xác nhận theo đúng mục đích sử dụng và hiệu quả sử dụng phải được kiểm tra trong suốt quá trình sử dụng, khi thích hợp.

Khi cần, thiết bị và các dụng cụ kiểm tra phải được hiệu chuẩn theo chuẩn quốc gia và hiệu chuẩn lại và các lần kiểm tra trung gian phải được thực hiện, quy trình kiểm tra và kết quả phải được ghi lại.

Tất cả máy móc và thiết bị phải được kiểm tra định kỳ và duy trì để đảm bảo tính an toàn và phù hợp cho mục đích sử dụng. Dụng cụ cần được kiểm tra theo các điều kiện làm việc và độ chính xác yêu cầu đối với kết quả.

Tần suất hiệu chuẩn và kiểm tra xác nhận đối với từng hạng mục của thiết bị mà trong nhiều trường hợp không quy định trong tiêu chuẩn này, vì nó được xác định bởi từng phòng thử nghiệm, tùy thuộc vào loại thiết bị và mức độ hoạt động của phòng thử nghiệm, và phù hợp với chỉ dẫn của nhà sản xuất. Trong một số trường hợp nhất định, có quy định tần suất vì vấn đề đó được coi là cần thiết.

Thiết bị và dụng cụ phải được thiết kế và lắp đặt thích hợp cho thao tác và để bảo dưỡng, làm sạch khử nhiễm và hiệu chuẩn.

Sự không đảm bảo đo đưa ra trong điều này liên quan đến thiết bị, dụng cụ có liên quan và không cho toàn bộ phương pháp phân tích.

Xuyên suốt cả điều này, các yêu cầu về độ chính xác của phép đo của thiết bị đo đã quy định. Điều này dựa vào dung sai thực tế yêu cầu để chứng minh việc kiểm soát thích hợp của thiết bị khi sử dụng hàng ngày. Độ chính xác đã nêu liên quan đến độ không đảm bảo đo lường của thiết bị (xem ISO guide 99).

Đối với thiết bị kiểm soát nhiệt độ thì kiểm tra độ ổn định và tính đồng nhất của nhiệt độ trước khi bắt đầu sử dụng và sau khi sửa chữa hoặc thay đổi mà có thể làm ảnh hưởng đến việc kiểm soát nhiệt độ.

5.2 Tủ bảo vệ

5.2.1 Mô tả

Tủ bảo vệ là vị trí làm việc được trang bị luồng khí thổi, thổi theo chiều ngang hoặc chiều dọc để loại bỏ bụi và các chất hạt khác như các vi khuẩn từ không khí.

Số lượng hạt cho phép tối đa trên mét khối có cỡ lỗ bằng hoặc lớn hơn 0,5 μm thể hiện cấp loại của tủ an toàn. Đối với các tủ dùng cho vi sinh vật trong thực phẩm, thì số lượng chất hạt không được quá 4000 trên mét khối.

TCVN 6404:2008

Tủ dùng cho vi sinh vật trong thực phẩm có bốn loại:

- a) Tủ an toàn loại I là các tủ bảo vệ cửa mở trước dùng để bảo vệ người thực hiện và môi trường nhưng không bảo vệ được sản phẩm khỏi sự nhiễm bẩn bên ngoài. Khả năng bị nhiễm sol khí sẽ xảy ra trong buồng và giữ lại trên bộ lọc. Không khí đã lọc thường thải ra môi trường; nếu không thực hiện được điều đó thì không khí phải cho đi qua hai bộ lọc HEPA được treo thành dãy. Chúng không nên dùng cho các sinh vật gây bệnh nguy cơ cấp 3 vì khó duy trì và bảo vệ được người thực hiện.
- b) Tủ an toàn loại II bảo vệ được sản phẩm, người thực hiện và môi trường. Quay vòng được một lượng không khí đã lọc, đưa một lượng khí ra môi trường và thay không khí qua lỗ hồng làm việc, do đó bảo vệ được người thực hiện. Chúng thích hợp cho việc thực hiện với vi sinh vật gây bệnh nguy cơ cấp 3.
- c) Các tủ thổi đẩy không khí ngang bảo vệ nơi làm việc khỏi bị nhiễm bẩn, nhưng thổi hết sol khí vào mặt người thực hiện. Do đó, chúng không thích hợp cho việc xử lý dịch cấy hoặc nuôi cấy mô.
- d) Các tủ thổi đẩy không khí dọc bảo vệ sản phẩm bằng cách sử dụng dòng không khí đã lọc bằng HEPA. Chúng cũng bảo vệ người thực hiện qua việc sử dụng không khí quay vòng bên trong. Các loại tủ này đặc biệt thích hợp để có môi trường vô trùng để xử lý sản phẩm vô trùng và bảo vệ người thực hiện khi xử lý với sản phẩm dạng bột.

Sử dụng các tủ bảo vệ cho tất cả các công việc liên quan đến xử lý các vi sinh vật gây bệnh và các sản phẩm dạng bột bị nhiễm, nếu quy định quốc gia cho phép.

Việc sử dụng đầu đốt bằng khí hoặc lò nung không được dùng trong các tủ bảo vệ. Nếu cần thì đầu đốt bằng khí cần phải có ngọn lửa nhỏ sao cho không làm nhiễu loạn dòng không khí. Cách khác, có thể sử dụng dụng cụ dùng một lần (vòng cấy, pipet.v.v...).

5.2.2 Sử dụng

Các tủ không nên lưu giữ dụng cụ.

Khi có thể, đặt tất cả những thứ cần thiết vào trong tủ trước khi bắt đầu làm việc để giảm thiểu các động tác ra vào lỗ hở làm việc. Bố trí dụng cụ và vật liệu sao cho tối thiểu hoá sự nhiễu loạn của dòng không khí tại lỗ hở làm việc.

Người thực hiện cần được đào tạo sử dụng tủ đúng cách để đảm bảo an toàn cho người thực hiện và đảm bảo sự nguyên vẹn của sản phẩm hoặc dịch cấy.

5.2.3 Làm sạch và khử trùng

Làm sạch và khử trùng khu vực làm việc sau khi sử dụng, dùng chất tẩy rửa không ăn mòn thích hợp theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Thường xuyên kiểm tra lưới bảo vệ của bộ lọc sơ bộ và làm sạch bằng khăn vải ngâm dung dịch tẩy rửa.

Đối với các tủ thổi không khí theo lớp thì bề mặt của bộ lọc phải thường xuyên làm sạch bằng chân không, chú ý không làm hỏng môi trường của bộ lọc.

Các tủ an toàn có thể được xông hơi trước khi thay hoặc sửa chữa bộ lọc.

Sau khi làm sạch tủ, có thể sử dụng đèn UV để khử trùng. Đèn UV cần được làm sạch và thay thế thường xuyên theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

5.2.4 Bảo dưỡng và kiểm tra

Các tủ an toàn được sử dụng thích hợp với mục đích và điều kiện môi trường trong phòng thử nghiệm.

Hiệu quả của tủ bảo vệ phải được một nhân viên có chuyên môn kiểm tra thường xuyên theo chỉ dẫn của nhà sản xuất, cũng như sau khi sửa chữa hoặc thay đổi.

Việc kiểm tra định kỳ về sự không bị nhiễm bẩn vi sinh vật cần được tiến hành bằng cách kiểm tra bề mặt làm việc và thành tủ.

Việc kiểm tra định kỳ số lượng vi sinh vật gây bệnh có mặt cần được thực hiện trong suốt quá trình thực hiện của bộ lọc sử dụng dụng cụ thông thường. Ví dụ, trong mỗi tủ đặt vài đĩa petri mở nắp đã chứa một môi trường nuôi cấy thạch không chọn lọc (ví dụ PCA) trong 30 min. Cũng có thể dùng các phương pháp khác.

5.3 Cân và dụng cụ pha loãng định lượng

5.3.1 Sử dụng và độ không đảm bảo đo

Cân thường được dùng để xác định khối lượng phần mẫu thử và các thành phần của môi trường nuôi cấy và thuốc thử. Ngoài ra, chúng cũng có thể được dùng để đo các thể tích dung dịch pha loãng theo khối lượng.

Dụng cụ pha loãng định lượng là các dụng cụ điện tử gồm có cân và bộ phận phân phối dung dịch lỏng có cài đặt chương trình và được sử dụng trong quá trình chuẩn bị các huyền phù ban đầu của mẫu; chúng thực hiện bằng cách thêm dịch pha loãng vào mẫu con theo một tỷ lệ đã định trước. Mẫu con sau đó được cân đến dung sai cho phép và bộ phận định lượng cài đặt để phân phối đủ lượng dịch pha loãng theo tỷ lệ yêu cầu (ví dụ: 9:1 đối với các dung dịch pha loãng thập phân).

Phòng thử nghiệm vi sinh vật trong thực phẩm phải được trang bị các cân có dải đo và độ không đảm bảo đo quy định đối với các sản phẩm khác nhau cần phải cân.

Khi cân mẫu thử, sai số tối đa cho phép phải bằng 1 % hoặc tốt hơn, trừ khi có quy định khác.

TCVN 6404:2008

Đặt dụng cụ lên mặt phẳng nằm ngang vững chắc, điều chỉnh khi cần để đảm bảo thăng bằng và chống rung và chống trượt.

5.3.2 Làm sạch và khử trùng

Làm sạch dụng cụ và khử trùng sau mỗi lần sử dụng hoặc bị đổ ra trong khi cân bằng chất tẩy rửa thích hợp và không ăn mòn.

5.3.3 Kiểm tra hiệu quả và hiệu chuẩn

Hiệu quả của hệ thống cân cần kiểm tra xác nhận thường xuyên trong quá trình sử dụng và sau khi làm sạch bằng cách kiểm tra khối lượng do người có chuyên môn thực hiện. Việc hiệu chuẩn cần được kiểm tra thông qua toàn bộ dải đo phụ thuộc vào tần suất sử dụng.

Việc kiểm tra khối lượng cũng có thể được xác nhận ngay sau khi hiệu chuẩn cân.

5.4 Thiết bị đồng hoá, bộ trộn và máy trộn

5.4.1 Mô tả

Thiết bị này được dùng để chuẩn bị huyền phù ban đầu từ mẫu thử của sản phẩm không ở dạng lỏng.

Có thể dùng các thiết bị sau đây:

- thiết bị đồng hoá kiểu nhu động (dạng túi) với các túi chất dẻo vô trùng, có thể kèm bộ điều chỉnh tốc độ và thời gian; hoặc
- thiết bị đồng hoá kiểu quay (bộ trộn), có tốc độ quay từ 8 000 r/min đến 45 000 r/min, kèm theo bình chứa bằng kim loại hoặc thủy tinh có nắp và có thể khử trùng được, hoặc
- máy trộn kiểu rung (máy tạo xung) có các túi vô trùng; hoặc
- hệ thống đồng hoá khác có hiệu quả tương tự.

Trong các trường hợp cụ thể, có thể thực hiện việc trộn bằng tay sử dụng các viên bi thủy tinh có đường kính thích hợp [khoảng 6 mm, xem TCVN 6507-2 (ISO 6887-2) đến TCVN 6507-4 (ISO 6884-4) và TCVN 6263 (ISO 8261)]

5.4.2 Sử dụng

Thời gian hoạt động thông thường của thiết bị đồng hoá kiểu nhu động khoảng 1 min đến 3 min [xem TCVN 6507-2 (ISO 6887-2) đến TCVN 6507-4 (ISO 6887-4) và TCVN 6263 (ISO 8261) đối với các loại thực phẩm cụ thể].

Loại thiết bị này không dùng được cho một số thực phẩm như:

- các sản phẩm có thể làm thùng túi (có các hạt nhọn sắc, cứng, khô);
- các sản phẩm khó đông hoá do cấu trúc của chúng (ví dụ: xúc xích loại salami).

Thiết bị đông hoá kiểu quay có thể vận hành trong một khoảng thời gian với tốc độ từ 15000 r/min đến 20000 r/min. Nhưng với thiết bị đông hoá có tốc độ chậm nhất thì thời gian vận hành cũng không được vượt quá 2,5 min.

Máy trộn rung có thể được dùng cho hầu hết các loại thực phẩm, kể cả loại cứng hoặc sản phẩm khô. Thời gian trộn thường từ 0,5 min đến 1 min. Nếu các vi sinh vật nằm sâu trong các cấu trúc thì cần cắt mẫu thành các mảnh nhỏ trước khi thực hiện.

Các bi thủy tinh có thể được dùng để chuẩn bị các huyền phù ban đầu bằng cách lắc sản phẩm có độ nhớt hoặc sản phẩm đặc nhất định, đặc biệt là đối với sản phẩm sữa (xem các tiêu chuẩn cụ thể).

5.4.3 Làm sạch và khử trùng

Định kỳ làm sạch và khử trùng các bộ đông hoá kiểu nhu động và các bộ trộn kiểu rung và sau khi túi đựng bị tràn hoặc rò rỉ.

Đối với các bộ đông hoá kiểu quay, sau mỗi lần sử dụng, làm sạch và khử trùng các viên bi thủy tinh và bát kim loại.

5.4.4 Bảo dưỡng

Kiểm tra và duy trì dụng cụ theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

5.5 Máy đo pH

5.5.1 Mô tả

Máy đo pH dùng để đo hiệu thế giữa điện cực đo và điện cực đối chiếu ở nhiệt độ xác định, cả hai điện cực đều được đưa vào sản phẩm. Máy đo pH này có thể đo chính xác đến $\pm 0,05$ đơn vị pH và có độ phân giải là 0,01 đơn vị pH. Máy đo pH có bộ cân bằng nhiệt bằng tay hoặc tự động.

CHÚ THÍCH Điện cực đo và điện cực đối chiếu thường được gắn với nhau thành hệ thống điện cực kết hợp.

5.5.2 Sử dụng

Máy đo pH được dùng để đo giá trị pH của môi trường nuôi cấy và thuốc thử để kiểm tra xem trong quá trình chuẩn bị có cần điều chỉnh hay không và để kiểm tra chất lượng sau khi khử trùng.

TCVN 6404:2008

Máy đo pH cũng có thể được sử dụng để đo giá trị pH của mẫu thử và các huyền phù của mẫu. Việc sử dụng máy đo pH sẽ được thảo luận trong tiêu chuẩn cụ thể về sản phẩm cần phân tích, trong đó các điều kiện xác định pH và điều chỉnh pH được qui định.

Chỉnh máy đo pH theo chỉ dẫn của nhà sản xuất để đo giá trị pH ở nhiệt độ chuẩn, ví dụ ở 25 °C. Đọc giá trị pH sau khi đã ổn định. Ghi lại giá trị pH đến hai chữ số thập phân.

CHÚ THÍCH Số đọc được coi là đã ổn định khi giá trị pH đo được trong 5 s dao động không quá 0,02 đơn vị pH. Sử dụng các điện cực trong tình trạng tốt, trạng thái cân bằng đạt được trong khoảng 30 s.

5.5.3 Kiểm tra xác nhận và đánh giá

Hàng ngày trước mỗi lần sử dụng, kiểm tra máy đo pH theo chỉ dẫn của nhà sản xuất, sử dụng ít nhất hai hoặc ba dung dịch đệm chuẩn. Xác định các sai số tối đa cho phép đối với việc kiểm tra xác nhận này tùy thuộc vào việc sử dụng.

Các dung dịch chuẩn có các giá trị pH biết trước chính xác tới hai số thập phân ở nhiệt độ đo (nói chung, pH bằng 4,00, pH bằng 7,00 và/hoặc pH bằng 9,00 ở nhiệt độ 25 °C, theo chỉ dẫn của nhà sản xuất). Các dung dịch chuẩn này phải phải bao trùm các giá trị pH cần đo.

Sau khi kiểm tra xác nhận máy đo pH với hai dung dịch đệm chuẩn, thì pH phải được kiểm tra bằng cách sử dụng dung dịch đệm thứ ba, được gọi là dung dịch đệm kiểm chứng, ví dụ pH bằng 5 hoặc bằng 8.

Đánh giá máy đo pH khi việc kiểm tra cho các kết quả nằm ngoài dải sai số cho phép tối đa và thực hiện theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Việc đánh giá này có thể thực hiện bằng cách hiệu chuẩn cho phép ước tính độ không đảm bảo đo của máy đo pH.

5.5.4 Bảo dưỡng

Kiểm tra và bảo dưỡng các điện cực theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Trong trường hợp cụ thể, cần phải kiểm tra thường xuyên, nếu cần:

- tình trạng các điện cực về mức độ bẩn và lão hóa; và
- thời gian cho kết quả và độ ổn định.

Sau mỗi lần sử dụng, tráng đầu đo của các điện cực trong nước cất hoặc nước đã loại ion. Để đánh giá mức bẩn và mức độ lão hoá của các điện cực đo, phải thường xuyên rửa các điện cực thật sạch theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Bảo quản các điện cực theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

5.6 Nồi hấp áp lực

5.6.1 Mô tả

Nồi hấp áp lực là thiết bị đạt được nhiệt độ của hơi nước bão hoà và được dùng để diệt các vi sinh vật.

Nồi hấp áp lực cần được trang bị kèm theo:

- ít nhất một van an toàn,
- van xả,
- bộ phận duy trì nhiệt độ quy định trong buồng với khoảng ± 3 °C của nhiệt độ đích (có tính đến độ không đảm bảo đo liên quan đến cặp nhiệt điện); và
- đầu dò nhiệt độ hoặc cặp nhiệt điện tự ghi.

Nồi hấp áp lực cũng được gắn với bộ đọc thời gian và đọc nhiệt độ.

5.6.2 Sử dụng

Với phương pháp khử trùng bằng hơi, tất cả không khí được đuổi ra trước khi tạo áp lực. Nếu như nồi hấp áp lực không được gắn với một thiết bị hút chân không tự động, thì cần phải đuổi không khí cho đến khi ống phun luồng hơi nước liên tục phát ra.

Để diệt các vi sinh vật, hơi bão hoà trong buồng phải có nhiệt độ ít nhất là 121 °C.

Trong cùng một chu kỳ khử trùng, nồi hấp áp lực không được sử dụng để khử trùng các dụng cụ sạch (và/hoặc môi trường nuôi cấy) cùng với khử bẩn các dụng cụ đã sử dụng (và/hoặc môi trường nuôi cấy đã sử dụng).

Tốt nhất là sử dụng các nồi hấp áp lực riêng biệt cho hai quá trình này. Sau khi hấp áp lực, tất cả vật liệu và dụng cụ phải được làm nguội trong nồi hấp trước khi lấy ra.

Vì lý do an toàn, không lấy đồ ra khỏi nồi hấp áp lực khi nhiệt độ chưa giảm đến dưới 80 °C.

5.6.3 Bảo dưỡng

Định kỳ làm sạch khoang chứa, bộ lọc xả và cửa kín. Kiểm tra độ kín của cửa. Tiến hành xả và cạo sạch cặn, nếu cần, trong các khoảng thời gian nhất định. Tiến hành theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

5.6.4 Kiểm tra xác nhận và hiệu chuẩn

Phải giữ nồi hấp áp lực ở điều kiện làm việc tốt và phải kiểm tra thường xuyên được các bộ phận có năng lực kiểm tra theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

TCVN 6404:2008

Tất cả các dụng cụ kiểm tra phải giữ trong trạng thái làm việc tốt và do bộ phận có thẩm quyền kiểm tra định kỳ.

Việc kiểm tra đánh giá ban đầu cần bao gồm các nghiên cứu hiệu quả của mỗi chu kỳ thực hiện và mỗi kiểu nạp sản phẩm được sử dụng trong thực tế. Quá trình này cần được lặp lại sau khi sửa chữa hoặc thay đổi. Các bộ cảm biến nhiệt cần được bố trí trong sản phẩm để biết nhiệt đã được truyền vào tất cả các vị trí. Việc kiểm tra và kiểm tra lại cần được xem xét sự phù hợp của thời gian nâng nhiệt và hạ nhiệt cũng như nhiệt độ khử trùng.

Để kiểm tra quá trình nhiệt khi không có sẵn các dữ liệu đánh giá hiệu quả quá trình, thì đối với mỗi mẻ sản phẩm, cần đặt ở tâm sản phẩm tối thiểu một chỉ thị quá trình.

5.7 Thiết bị chuẩn bị môi trường

5.7.1 Mô tả

Thiết bị chuẩn bị môi trường được thiết kế theo nguyên tắc để khử trùng một lượng lớn môi trường (> 1 l). Bộ phận này bao gồm một bể làm nóng, túi nước và dụng cụ khuấy liên tục. Thiết bị này cũng được lắp bộ phận đo nhiệt độ, bộ phận đo áp suất, đo thời gian và van an toàn.

Ngoài ra, bộ phận này cần có khoá an toàn để không mở khi nhiệt độ chưa xuống đến < 80 °C.

5.7.2 Sử dụng

Thực hiện theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Toàn bộ quá trình chuẩn bị được thực hiện ngay trong thiết bị. Sau khi bổ sung tất cả các thành phần, khuấy và làm nóng để hoà tan rồi đem khử trùng.

5.7.3 Bảo dưỡng

Rửa thiết bị chuẩn bị môi trường và tráng kỹ bằng nước cất sau khi chuẩn bị mỗi mẻ môi trường.

5.7.4 Kiểm tra xác nhận

Phải giữ thiết bị chuẩn bị môi trường ở điều kiện làm việc tốt và phải được bộ phận có năng lực kiểm tra thường xuyên theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Tất cả các dụng cụ kiểm tra phải giữ trong trạng thái làm việc tốt và kiểm tra định kỳ hiệu quả của chúng.

Việc kiểm tra đánh giá ban đầu cần bao gồm các nghiên cứu hiệu quả của mỗi chu kỳ thực hiện và mỗi kiểu nạp sản phẩm được sử dụng trong thực tế. Quá trình này cần được lặp lại sau khi sửa chữa hoặc

thay đổi. Có thể sử dụng hai đầu dò nhiệt, một để sát với đầu dò đối chúng và một để cách xa hẳn để biết nhiệt đã đều hay chưa.

Cần kiểm tra nhiệt độ và thời gian của mỗi chu kỳ.

5.8 Tủ ấm

5.8.1 Mô tả

Tủ ấm bao gồm một buồng giữ nhiệt có nhiệt độ ổn định và phân phối đều, với sai số nhiệt độ tối đa cho phép quy định trong tiêu chuẩn này.

5.8.2 Sử dụng

Các tủ ấm cần được trang bị các hệ thống điều chỉnh để giữ được nhiệt độ hoặc các thông số khác đều và ổn định trong khắp vùng làm việc. Xác định thể tích làm việc để đảm bảo rằng điều đó đã đạt được.

Nếu nhiệt độ môi trường gần bằng hoặc cao hơn nhiệt độ của tủ ấm, thì cần phải bố trí một hệ thống làm mát.

Bảo vệ các thành của tủ ấm tránh ánh sáng mặt trời chiếu thẳng.

Nếu có thể, khi sử dụng bất kỳ loại tủ ấm nào (đối lưu không khí bắt buộc hoặc không), các tủ ấm không nên để đầy quá bởi vì môi trường nuôi cấy sẽ cần nhiều thời gian hơn để cân bằng nhiệt độ. Tránh mở tủ ấm nhiều lần trong thời gian dài.

Khi xếp mẫu vào tủ ấm phải chú ý tới sự lưu thông không khí (xem 10.2.4).

5.8.3 Làm sạch và khử trùng

Định kỳ làm sạch và khử trùng thành trong và ngoài của tủ ấm, nếu thích hợp, lau sạch bụi hệ thống thông gió.

5.8.4 Kiểm tra xác nhận

Sự ổn định nhiệt độ và sự phân bố nhiệt đồng đều trong khoang làm việc của tủ ấm phải được kiểm tra bằng nhiệt kế hoặc bằng cặp nhiệt điện biết trước độ chính xác và dải nhiệt thích hợp.

Dùng thông tin để xác định dải làm việc có thể chấp nhận được của tủ ấm và vị trí tối ưu của nhiệt kế sử dụng để kiểm tra nhiệt độ làm việc.

Ví dụ, để đạt được nhiệt độ đích là $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ khi nhiệt độ trong tủ dao động từ $36,8\text{ °C}$ đến $37,3\text{ °C}$, thì cần được giảm đến $36,2\text{ °C}$ đến $37,7\text{ °C}$ để đảm bảo rằng tất cả các phần của tủ ấm đã đạt được nhiệt độ quy định là 37 °C .

Lập lại quy trình này sau mỗi lần sửa chữa hoặc thay đổi.

TCVN 6404:2008

Phải kiểm tra tính ổn định của nhiệt độ, ví dụ, bằng một hoặc nhiều nhiệt kế có giá trị lớn nhất và nhỏ nhất hoặc các cặp nhiệt điện tự ghi.

Nhiệt kế và cặp nhiệt điện tự ghi được dùng để kiểm tra tủ ấm hàng ngày, được gắn ở một vị trí cố định để đạt được nhiệt độ đích.

Để kiểm tra nhiệt độ tủ ấm hàng ngày, mỗi tủ ấm cần được gắn với ít nhất là một nhiệt kế, có bầu chất đo được ngâm trong glyxerol (hoặc bể nhiệt thích hợp khác) được đựng trong chai gắn xi kín.

Các hệ thống kiểm tra khác có tính năng tương tự có thể được sử dụng.

5.9 Tủ lạnh và phòng bảo quản lạnh

5.9.1 Mô tả

Các tủ này là các buồng có thể duy trì được chế độ bảo quản lạnh. Khi không có qui định khác, nhiệt độ bảo quản thực phẩm phải là $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (sai số tối đa cho phép). Đối với các mục đích bảo quản khác, thì nhiệt độ phải là $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, trừ khi có quy định khác.

5.9.2 Sử dụng

Để tránh nhiễm bẩn chéo, thì sử dụng các buồng khác nhau hoặc ít nhất là các vật chứa khác nhau để bảo quản tách riêng:

- môi trường cấy chưa cấy và thuốc thử,
- mẫu thử, và
- các chủng vi sinh vật và các môi trường đã cấy.

Các tủ lạnh, các ngăn lạnh và phòng bảo quản lạnh cần được sắp xếp sao cho đảm bảo được sự lưu thông không khí và giảm thiểu khả năng gây nhiễm bẩn chéo.

5.9.3 Kiểm tra xác nhận

Mỗi ngày làm việc phải kiểm tra nhiệt độ của từng buồng bằng một nhiệt kế hoặc bằng đầu dò được đặt cố định. Độ chính xác yêu cầu của thiết bị kiểm tra nhiệt độ phụ thuộc vào mục đích sử dụng.

5.9.4 Bảo dưỡng và làm sạch

Phải thường xuyên thực hiện các công việc bảo dưỡng sau đây:

- lau bụi ở các cánh quạt hoặc ở các tấm trao đổi nhiệt phía ngoài;
- làm tan băng;
- làm sạch và khử trùng mặt trong của tủ.

5.10 Tủ đông lạnh và tủ đông lạnh sâu

5.10.1 Mô tả

Tủ đông lạnh có các buồng lạnh cho phép duy trì chế độ bảo quản đông lạnh. Trừ khi có qui định khác, nhiệt độ này phải nhỏ hơn -15°C , tốt nhất là -18°C đối với các mẫu thực phẩm.

Tủ đông sâu có các buồng lạnh cho phép duy trì chế độ bảo quản đông lạnh sâu. Trừ khi có qui định khác, nhiệt độ này phải nhỏ hơn -70°C .

5.10.2 Sử dụng

5.10.2.1 Tủ đông lạnh

Cần có các ngăn lạnh khác nhau hoặc ít nhất là có các vật chứa khác nhau để bảo quản tách riêng:

- thuốc thử chưa cấy,
- các mẫu phân tích, và
- các chủng sinh vật.

Xếp đặt trong tủ đông lạnh sao cho duy trì được nhiệt độ đủ thấp, đặc biệt là khi đưa các sản phẩm chưa đông lạnh vào.

5.10.2.2 Tủ đông lạnh sâu

Nguyên tắc sử dụng là để bảo quản vi sinh vật, chủng đối chứng và/hoặc dịch cấy làm việc và thuốc thử.

Xếp đặt trong tủ đông lạnh sao cho duy trì được nhiệt độ đủ thấp và tránh nhiễm bẩn chéo giữa các vi sinh vật và thuốc thử.

5.10.3 Kiểm tra xác nhận

Định kỳ kiểm tra nhiệt độ của từng buồng dùng dụng cụ kiểm tra nhiệt độ thích hợp.

5.10.4 Bảo dưỡng

Phải thường xuyên thực hiện các công việc bảo dưỡng sau đây:

- lau bụi ở cánh quạt hoặc ở tấm trao đổi nhiệt phía ngoài (nếu có thể);
- làm tan băng;
- làm sạch và sát trùng mặt trong của tủ.

TCVN 6404:2008

5.11 Bể điều nhiệt

5.11.1 Mô tả

Bể điều nhiệt được làm đầy bằng chất lỏng (nước, etylen glycol .v.v...) có hoặc không có nắp đậy hoặc dụng cụ khác để hạn chế sự bay hơi, cần thiết để duy trì nhiệt độ quy định. Kiểm soát nhiệt độ thường chính xác hơn so với tủ ấm bằng không khí, các sai số tối đa cho phép $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ hoặc tốt hơn. Nhiệt độ làm việc và các sai số tối đa cho phép được quy định trong từng phương pháp cụ thể. Hệ thống làm lạnh là cần thiết để duy trì nhiệt độ gần bằng hoặc thấp hơn nhiệt độ môi trường.

5.11.2 Sử dụng

Các mục đích sử dụng chính như sau:

- ủ môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ quy định;
- duy trì môi trường thạch tan chảy vô trùng trong khi chuẩn bị môi trường;
- trộn môi trường thạch tan chảy vô trùng sử dụng các phương pháp cụ thể;
- chuẩn bị các huyền phù ban đầu hoặc các dung dịch pha loãng ở nhiệt độ quy định;
- xử lý nhiệt các huyền phù mẫu ban đầu ở nhiệt độ quy định (ví dụ như thanh trùng).

Để kiểm tra nhiệt độ chính xác, bể điều nhiệt cần được trang bị một bơm nước tuần hoàn và một hệ thống điều nhiệt tự động. Việc khuấy trộn chất lỏng không được làm phân tán.

Các bể có nắp đậy thích hợp hơn đối với độ chính xác hoặc sử dụng nhiệt độ cao. Nên sử dụng nắp đậy cho phép thoát phần nước ngưng tụ.

Để ủ môi trường đã cấy, duy trì mức chất lỏng sao cho đỉnh của môi trường thử thấp hơn mức chất lỏng trong bể ít nhất là 2 cm trong suốt quá trình ủ.

Các vật chứa khác cần được đặt trong bể sao cho mức trong vật chứa thấp hơn mức chất lỏng.

Độ ngập sâu phải ngăn ngừa nước vào qua việc đóng kín.

Có thể cần đến bộ phận duy trì sự ổn định của vật chứa, ví dụ: giá đỡ.

Tất cả các vật chứa cần được làm khô sau khi lấy ra khỏi bể và trước khi sử dụng tiếp.

5.11.3 Kiểm tra xác nhận

Kiểm tra sự ổn định và sự phân bố đồng đều nhiệt độ trong khoang làm việc của bể trước khi sử dụng lần đầu và sau khi sửa chữa hoặc thay đổi có ảnh hưởng đến việc kiểm soát nhiệt độ.

Kiểm tra mỗi bể bằng nhiệt kế, cặp nhiệt điện hoặc thiết bị ghi nhiệt độ tự động có độ không đảm bảo đo tối thiểu thích hợp (xem 5.28.2) và phụ thuộc vào hệ thống điều nhiệt tự động.

Có thể sử dụng dụng cụ kỹ thuật số, với điều kiện là đã kiểm tra độ phân giải và độ chính xác.

Trong mỗi lần sử dụng, kiểm tra nhiệt độ của bể và ít nhất là hàng ngày trong giai đoạn ủ thêm.

5.11.4 Bảo dưỡng

Bể được đổ đầy chất lỏng theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Để ủ dịch cấy, tốt nhất là sử dụng nước cất hoặc nước đã loại khoáng.

Kiểm tra thường xuyên mức chất lỏng trong bể để đảm bảo đúng chức năng của bể và đáp ứng được yêu cầu của sản phẩm cần ngâm trong bể. Mức chất lỏng phải luôn ngập phủ bộ phận gia nhiệt.

Bể cần được thay nước, vệ sinh thường xuyên và tần suất phụ thuộc vào việc sử dụng hoặc sau khi bị tràn.

5.12 Nồi hơi, kể cả nồi cách thủy

5.12.1 Mô tả

Nồi hơi hoặc nồi cách thủy gồm có bộ phận làm nóng được nước bao quanh trong bình có nắp đậy kín. Trong nồi hơi, bộ phận này tạo hơi ở áp suất khí quyển; trong nồi cách thủy thì bộ phận này làm nóng nước đến nhiệt độ gần hoặc bằng nhiệt độ của điểm sôi, có hoặc không tạo ra hơi.

5.12.2 Sử dụng

Mục đích sử dụng chính là:

- làm tan chảy môi trường thạch;
- chuẩn bị môi trường để phân huỷ nhiệt;
- giảm lây nhiễm của các bộ phận nhỏ của thiết bị trong khi sử dụng.

Mức an toàn và đủ của nước trong bình phải đảm bảo để ngập các bộ phận làm nóng.

Có thể sử dụng nồi hấp áp lực không tạo hơi.

5.12.3 Bảo dưỡng

Giữ sạch các nồi hơi và các nồi cách thủy.

Định kỳ cạo sạch cặn, tần suất phụ thuộc vào độ cứng của nước, nếu cần.

TCVN 6404:2008

5.13 Tủ khử trùng

5.13.1 Mô tả

Tủ khử trùng là một buồng có thể duy trì được nhiệt độ từ 160 °C đến 180 °C để diệt các vi sinh vật bằng nhiệt khô.

5.13.2 Sử dụng

Chỉ khử trùng thiết bị bằng kim loại hoặc bằng thủy tinh trong tủ khử trùng; không dùng để khử trùng dụng cụ bằng chất dẻo và cao su.

Trước khi khử trùng, làm sạch dụng cụ thủy tinh và kim loại trong tủ sấy.

Nếu khử trùng các dụng cụ thủy tinh dùng để định mức thì phải định kỳ kiểm tra độ chính xác của các thể tích đã đánh dấu.

Nhiệt độ cần phân bố đều trong buồng sấy. Tủ sấy phải được trang bị bộ ổn nhiệt và một nhiệt kế hoặc dụng cụ đo nhiệt tự ghi có độ chính xác thích hợp.

Tủ sấy cần được gắn với đồng hồ hoặc bộ phận đặt chương trình hoặc thời gian.

Khi nhiệt độ yêu cầu đã đạt được, thì quy trình khử trùng phải được kéo dài ít nhất là 1 h ở 170 °C hoặc kết hợp tương đương của thời gian/nhiệt độ.

Sau khi khử trùng, để tránh bị rạn nứt, dụng cụ thủy tinh cần được để nguội trong tủ trước khi lấy ra.

5.13.3 Kiểm tra xác nhận

Kiểm tra độ ổn định và tính đồng nhất của nhiệt độ trong khắp tủ trước khi sử dụng và sau khi sửa chữa hoặc thay đổi mà có thể ảnh hưởng đến việc kiểm soát nhiệt độ.

Tủ được gắn một nhiệt kế đã hiệu chuẩn, dụng cụ đo nhiệt tự ghi có độ chính xác thích hợp phụ thuộc vào hệ thống điều nhiệt tự động. Dụng cụ kiểm soát nhiệt cần có độ phân giải là 1 °C hoặc tốt hơn ở nhiệt độ sử dụng.

Nhiệt độ của tủ cần được thường xuyên kiểm tra và ghi lại trong mỗi lần sử dụng.

5.13.4 Bảo dưỡng

Làm vệ sinh bề mặt phía trong khi cần.

5.14 Lò vi sóng

5.14.1 Mô tả

Lò vi sóng là thiết bị dùng sóng cực ngắn để làm nóng sản phẩm ở áp suất khí quyển.

5.14.2 Sử dụng

Hiện tại chỉ có thiết bị để làm nóng chất lỏng hoặc làm tan chảy môi trường thạch nuôi cấy.

CẢNH BÁO – Không làm nóng môi trường có chứa các thành phần dễ bị hỏng do nhiệt trong lò vi sóng trừ khi đã đánh giá được cách làm nóng này không ảnh hưởng đến hiệu quả của môi trường. Chưa có đánh giá nào về hiệu quả của lò vi sóng để khử trùng môi trường cấy và lò vi sóng không được dùng cho mục đích này.

Lò vi sóng phải làm nóng được chất lỏng và môi trường nuôi cấy bằng chu kỳ phát sóng cực ngắn kiểm soát được. Việc phân bố sóng cực ngắn phải đồng đều trong sản phẩm để tránh có những vùng bị quá nhiệt. Để phân bố nhiệt được tốt hơn, nên sử dụng thiết bị có gắn bộ xoay.

Không sử dụng dụng cụ bằng kim loại, kể cả nắp đậy bằng kim loại. Nới lỏng nắp hoặc nút trước khi làm nóng.

Làm nóng trong một khoảng thời gian dài ở năng lượng thấp hơn có thể cho kết quả phân bố nhiệt tốt hơn.

CẢNH BÁO – Thận trọng khi sử dụng các dụng cụ đã đốt nóng. Vật chứa trong lò vi sóng có thể trở nên quá nóng và sôi hoặc chai có thể bị nổ.

Khi làm tan chảy môi trường thạch, nên đặt ở mức năng lượng thấp (ví dụ: chu kỳ làm tan băng) và bể đun nước (ví dụ: từ 50 ml đến 100 ml nước trong cốc dùng cho lò vi sóng) để hỗ trợ việc kiểm soát nhiệt.

Thời gian sau khi gia nhiệt và trước khi lấy ra khỏi lò vi sóng nên kéo dài 5 min.

5.14.3 Kiểm tra xác nhận

Thời gian gia nhiệt thích hợp và cài đặt năng lượng phải được thiết lập trước khi bắt đầu đưa vào hoạt động đối với các thể tích chất lỏng khác nhau và môi trường cấy được xử lý hàng ngày, để đảm bảo hiệu quả tối ưu và tránh quá nhiệt cho sản phẩm dễ bị hỏng do nhiệt.

5.14.4 Bảo dưỡng

Làm sạch lò ngay khi bị đổ tràn, cũng như làm sạch định kỳ tùy thuộc vào việc sử dụng.

TCVN 6404:2008

Độ kín của cửa lò cần được kiểm tra và lò được kiểm tra về sự rò rỉ phóng xạ ở các khoảng thời gian đều đặn.

5.15 Máy rửa dụng cụ thủy tinh

5.15.1 Mô tả

Máy rửa dụng cụ thủy tinh của phòng thử nghiệm là các loại máy được điều khiển bằng điện tử dùng để rửa dụng cụ thủy tinh của phòng thử nghiệm, có thể cài đặt chương trình cho các chu kỳ tráng, rửa khác nhau (ví dụ: dùng nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc axit).

Dụng cụ rửa pipet thủy tinh là loại máy rửa đặc biệt để rửa các lỗ hẹp của pipet.

5.15.2 Sử dụng

Hiện có sẵn nhiều loại máy rửa dụng cụ thủy tinh, được lắp đặt và sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

5.15.3 Kiểm tra xác nhận

Kiểm tra hiệu quả rửa bằng mắt thường và trong một số ứng dụng cần qua các phép thử để đảm bảo rằng các dụng cụ thủy tinh không còn chứa các chất gây ức chế.

Có thể dùng dung dịch chỉ thị pH để kiểm tra lượng axit hoặc kiềm dư, pH nên ở khoảng từ 6,5 đến 7,3.

5.15.4 Bảo dưỡng

Chương trình bảo dưỡng định kỳ do nhà sản xuất quy định theo một tần suất thích hợp.

Có thể cần đến tần suất bảo dưỡng nhiều đối với thiết bị sử dụng nhiều hoặc ở những khu vực dùng nước cứng.

5.16 Kính hiển vi quang học

5.16.1 Mô tả

Có nhiều loại kính hiển vi khác nhau như: monocular, biocular, có VDU, camera hoặc dụng cụ phát huỳnh quang, v.v. và có nguồn sáng bên ngoài hoặc bên trong. Để kiểm tra vi sinh vật, các vật kính có độ khuếch đại từ 10 lần (thấu kính khô) đến 100 lần (nhúng trong dầu có tháp đặt tải trên lò xo) được sử dụng để thu được độ khuếch đại trên 100 lần đến 1000 lần. Kính hiển vi đối pha là thích hợp nhất để kiểm tra "các mẫu dạng ướt".

5.16.2 Sử dụng

Đặt mắt nhìn vào kính hiển vi theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Trục quang của ánh sáng từ bóng đèn cường độ cao phải đi qua tâm của tâm tụ quang, tiêu bản và vật kính đến thị kính.

5.16.3 Bảo dưỡng

Thực hiện theo chỉ dẫn của nhà sản xuất liên quan đến việc bảo quản, làm sạch và bảo dưỡng. Tránh ngưng tụ ẩm mà có thể dẫn đến suy giảm chất lượng của thấu kính.

Hàng ngày hoặc sau khi sử dụng, lau sạch thấu kính sao cho không làm ảnh hưởng đến chất lượng quang học, để loại bỏ hết dầu còn dính. Sử dụng dụng cụ do nhà sản xuất khuyến cáo. Định kỳ lấy dầu ra khỏi thấu kính của thị kính.

Hệ thống quang học có thể rất dễ bị hư hỏng và tốt nhất là bảo dưỡng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

5.17 Đầu đốt bằng ga hoặc lò đốt nóng bằng điện trở

5.17.1 Mô tả

Đầu đốt bằng ga (Bunsen) được dùng để tạo ra ngọn lửa hẹp từ khí ga đóng chai hoặc đường ống dẫn chính. Sự dao động lượng không khí trộn lẫn với khí ga khống chế mức độ nhiệt tạo thành.

Đốt nóng bằng điện trở sử dụng khí ga hoặc điện để đạt được nhiệt độ là không phát ra ngọn lửa để khử trùng vòng cấy và que cấy thẳng dùng để cấy dịch cấy.

5.17.2 Sử dụng

Đầu đốt bằng ga được dùng chính cho việc khử trùng vòng cấy và que cấy thẳng bằng kim loại bằng cách đốt và để khử trùng ngọn lửa các dụng cụ nhỏ khác.

Đốt nóng bằng điện trở sử dụng để khử trùng vòng cấy và que cấy thẳng bằng kim loại và thích hợp khi xử lý các vi sinh vật gây bệnh vì nó có thể ngăn ngừa được việc bắn tung toé và tránh được nguy cơ nhiễm bẩn chéo.

Đầu đốt bằng ga có thể tạo ra nhiều nhiệt và sự xáo trộn trong phòng thử nghiệm.

Kỹ thuật vô trùng khác có thể dùng mà không cần đến đầu đốt bằng ga bằng cách sử dụng các vật liệu dùng một lần.

Trong tủ bảo vệ nên tránh sử dụng đầu đốt bằng ga, vì chúng có thể làm xáo trộn dòng không khí. Khi đó nên dùng dụng cụ vô trùng sử dụng một lần.

5.17.3 Bảo dưỡng

Định kỳ làm sạch và khử trùng các đầu đốt và nắp đậy của thiết bị đốt nóng bằng điện trở, đặc biệt nếu dịch cấy vi khuẩn đã bị rơi rớt ra thiết bị.

5.18 Dụng cụ phân phối môi trường nuôi cấy và thuốc thử

5.18.1 Mô tả

Dụng cụ phân phối là một dụng cụ hay thiết bị dùng để phân phối môi trường nuôi cấy và thuốc thử vào các ống nghiệm, các lọ hoặc vào các đĩa petri. Các dụng cụ đó là ống đong, pipet hoặc xyranh thao tác bằng tay, từ xyranh tự động và bơm nhu động đến dụng cụ kiểm soát điện tử có đặt chương trình với các lượng phân phối tự động khác nhau.

5.18.2 Sử dụng

Dụng cụ sạch được dùng để phân phối môi trường cấy và thuốc thử không được chứa các chất gây ức chế. Sử dụng các đường ống riêng biệt cho môi trường chọn lọc để giảm thiểu việc lọc/mang sang của các chất như thế.

Nếu yêu cầu phân phối vô trùng môi trường cấy vô trùng và thuốc thử, thì tất cả các bộ phận của dụng cụ, thiết bị tiếp xúc với sản phẩm phân phối phải vô trùng.

5.18.3 Kiểm tra xác nhận

Độ không đảm bảo đo của dụng cụ hay thiết bị phải phù hợp với sai số tối đa cho phép của thể tích cần phân phối, thông thường không được vượt quá $\pm 5\%$. Sai số tối đa cho phép đối với các thể tích chất pha loãng dùng để pha loãng thập phân là $\pm 2\%$.

Kiểm tra các thể tích cần phân phối trước khi sử dụng, sau đó định kỳ kiểm tra theo quy định và sau các lần điều chỉnh mà ảnh hưởng đến thể tích cần phân phối.

5.18.4 Làm sạch và bảo dưỡng

Làm sạch bề mặt ngoài của bộ phận phân phối sau mỗi lần sử dụng. Rửa và tráng kỹ tất cả các bộ phận của bộ phận phân phối đã tiếp xúc với sản phẩm và khử trùng các bộ phận này nếu cần để phân phối chất lỏng vô trùng. Không dùng các chất tẩy rửa trên các bề mặt tiếp xúc với sản phẩm cần phân phối vì chúng có thể truyền các chất gây ức chế.

Tất cả các thiết bị phân phối tự động phải được giữ trong trạng thái tốt bằng cách bảo dưỡng định kỳ theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

15.19 Máy trộn Vortex

5.19.1 Mô tả

Máy khuấy này dùng để trộn đều các môi trường lỏng (ví dụ: dịch pha loãng thập phân và mẫu thử dạng lỏng) hoặc huyền phù của các tế bào vi sinh vật trong chất lỏng.

Việc trộn dựa trên nguyên lý là làm cho chất đựng trong ống nghiệm chuyển động xoay lệch tâm (Vortex).

5.19.2 Sử dụng

Ấn đáy ống nghiệm hoặc vật chứa chất lỏng cần trộn trên đầu máy trộn. Tốc độ trộn được kiểm soát bằng các tốc độ khác nhau của motor hoặc góc tiếp xúc với đầu máy trộn.

Người thực hiện cần chú ý để đảm bảo rằng trong quá trình trộn không làm tràn chất lỏng ra ngoài khi cần thiết phải điều chỉnh tốc độ và giữa ở khoảng cách một phần ba tính từ đỉnh ống để giữ ống được tốt hơn và tránh được việc chất lỏng dâng quá cao trong ống.

Cần chú ý để giảm thiểu sự giải phóng sol khí khi mở ống chứa trộn.

5.19.3 Kiểm tra xác nhận

Việc trộn thích hợp được biểu hiện theo dòng xoáy của chất lỏng trong quá trình trộn.

5.19.4 Bảo dưỡng

Giữ thiết bị sạch. Nếu sản phẩm bị rơi rớt thì phải khử nhiễm thiết bị bằng chất tẩy rửa thích hợp của phòng thử nghiệm.

5.20 Thiết bị đếm khuẩn lạc

5.20.1 Mô tả

Các thiết bị đếm khuẩn lạc thủ công sử dụng dụng cụ đếm sử dụng áp lực và số hiển thị là tổng số đếm các khuẩn lạc. Chúng có thể đơn giản là dụng cụ giống như bút hoặc có thể gồm một bàn rọi sáng có ô đã hiệu chuẩn cho đĩa và màn khuếch đại để phát hiện khuẩn lạc. Các máy đếm khuẩn lạc bằng điện tử tự động, kết hợp với máy phân tích hình ảnh, thực hiện bằng việc kết hợp của các hệ thống phần mềm và phần cứng sử dụng camera và bộ điều khiển.

5.20.2 Sử dụng

Sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Chính độ nhạy của máy đếm tự động để đếm được tất cả các khuẩn lạc mục tiêu. Các máy đếm khuẩn lạc bằng điện tử tự động cần có chương trình riêng biệt khi sử dụng các loại thạch và chất nền khác nhau và đối với các số đếm bề mặt và số đếm đĩa để đảm bảo phân biệt đúng các khuẩn lạc mục tiêu.

5.20.3 Kiểm tra xác nhận

Cần thực hiện việc kiểm tra bằng tay thông thường để đảm bảo rằng thu được các số đếm chính xác khi sử dụng máy đếm khuẩn lạc.

TCVN 6404:2008

Ngoài ra, các máy đếm khuẩn lạc tự động cần được kiểm tra hàng ngày sử dụng đĩa hiệu chuẩn chứa số lượng đã biết về chất hạt hoặc khuẩn lạc có thể đếm được.

5.20.4 Bảo dưỡng

Giữ thiết bị sạch và không bụi; tránh vạch lên các bề mặt đếm. Chương trình bảo dưỡng định kỳ các máy đếm điện tử có phân tích hình ảnh theo quy định của nhà sản xuất và với tần suất thích hợp.

5.21 Thiết bị cấy trong điều kiện không khí thay đổi

5.21.1 Mô tả

Đó là bình có thể gắn kín hoặc bất kỳ thiết bị nào khác có thể thay đổi môi trường nuôi cấy (ví dụ, dạng sinh trưởng yếm khí) được duy trì trong suốt thời gian ủ ấm môi trường cấy. Có thể dùng các hệ thống khác với tính năng tương đương, ví dụ buồng yếm khí.

Tuân thủ các hướng dẫn của nhà sản xuất trong việc lắp đặt và bảo dưỡng.

5.21.2 Sử dụng

Thành phần của môi trường khí thu được bằng cách bổ sung hỗn hợp khí (ví dụ từ bình khí) hoặc sau khi tạo chân không từ bình khí, bằng cách thay không khí trong buồng hoặc bằng cách khác thích hợp (ví dụ, gói tạo khí bán sẵn).

Nhìn chung, điều kiện ủ kỵ khí yêu cầu môi trường khí chứa ít hơn 1 % oxy, từ 9 % đến 13 % cacbon dioxide; điều kiện vi hiếu khí (capnaerobic) yêu cầu không khí chứa từ 5 % đến 7 % oxy, và khoảng 10 % cacbon dioxide.

Các điều kiện cần thay đổi phụ thuộc vào yêu cầu của từng loại vi sinh vật cụ thể.

5.21.3 Kiểm tra xác nhận

Đặt các dụng cụ chỉ thị sinh học và hoá học để kiểm tra bản chất của môi trường khí trong từng buồng mỗi khi sử dụng. Việc phát triển các chủng kiểm soát hoặc thay đổi màu của chỉ thị hoá học cho thấy rằng các điều kiện ủ thích hợp đã đạt được.

5.21.4 Bảo dưỡng

Nếu có chất xúc tác, cần phải thường xuyên phục hồi theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu có lập các van thì phải làm sạch và tra dầu để đảm bảo hoạt động đúng và thay khi cần.

Thiết bị này phải thường xuyên được làm sạch và khử trùng.

5.22 Máy ly tâm

5.22.1 Mô tả

Máy ly tâm là thiết bị cơ học hoặc điện tử sử dụng lực ly tâm để tách các hạt huyền phù, kể cả vi sinh vật ra khỏi chất lỏng.

5.22.2 Sử dụng

Trong một số ứng dụng, cô đặc vi sinh vật mục tiêu thu được bằng cách cho ly tâm các mẫu dạng lỏng để thu lấy phần lắng mà có thể hoà tan trong chất lỏng và cần cho kiểm tra tiếp theo.

Cần chú ý để tránh tạo ra sol khí và nhiễm bắn chéo bằng cách sử dụng thiết bị đúng cách và sử dụng các ống hoặc các bình ly tâm gắn kín và vô trùng.

5.22.3 Kiểm tra xác nhận

Khi tốc độ ly tâm đạt tới hạn hoặc đến mức quy định thì chỉ thị tốc độ hoặc cài đặt theo máy đo tốc độ tự đo đã hiệu chuẩn cần được kiểm tra định kỳ và sau những lần sửa chữa và thay đổi lớn.

5.22.4 Bảo dưỡng

Làm sạch và khử trùng các máy ly tâm định kỳ và sau khi bị rơi rớt các chủng vi khuẩn hoặc có khả năng bị nhiễm bắn mẫu.

Các máy ly tâm cần được bảo dưỡng định kỳ.

5.23 Bếp điện và lò nung

5.23.1 Mô tả

Bếp điện và lò nung là các thiết bị đốt nóng khống chế nhiệt độ ổn định. Một số bếp điện và lò nung có gắn hệ thống khuấy từ.

5.23.2 Sử dụng

Bếp điện và lò nung có gắn hệ thống khuấy từ được sử dụng để làm nóng các thể tích tương đối lớn của chất lỏng như môi trường.

Không sử dụng bếp điện và lò nung không có hệ thống khuấy từ để chuẩn bị môi trường.

5.23.3 Bảo dưỡng

Làm sạch hết các chất bị rơi rớt ngay khi thiết bị nguội.

5.24 Bộ phân phối dạng xoắn

5.24.1 Mô tả

Bộ phân phối dạng xoắn là dụng cụ phân phối để phân chia thể tích đã định của chất lỏng lên khắp bề mặt của đĩa thạch quay. Vòi phân phối chuyển động từ tâm đĩa đến mép ngoài theo hình xoắn ốc Archimedean. Thể tích được phân phối giảm dần theo kim phân phối chuyển động từ tâm đến mép đĩa, sao cho để có mối tương quan nghịch đảo giữa thể tích lắng xuống và bán kính vòng xoắn. Thể tích của mẫu phân phối trên bất kỳ đoạn cụ thể nào đều được biết và không đổi. Tạo chân không để nạp và phân phối chất lỏng.

5.24.2 Sử dụng

Thiết bị này được dùng để phân phối mẫu dạng lỏng, mẫu đồng nhất hoặc dung dịch pha loãng lên trên đĩa thạch thích hợp để đếm khuẩn lạc. Sau khi ủ, các khuẩn lạc phát triển theo các đường mà chất lỏng đã lắng. Số lượng khuẩn lạc trong vùng đã biết được đếm bằng các ô trên dụng cụ đếm và tính số đếm được.

Bề mặt các đĩa thạch được sử dụng với bộ phân phối dạng xoắn phải bằng phẳng và không có bọt khí.

Các đĩa phải được làm khô sơ bộ trước khi sử dụng để đảm bảo rằng các đĩa không bị quá ẩm.

Hệ thống phân phối cần được khử trùng và tráng rửa bằng nước vô trùng trước khi lấy mẫu và sau khi sử dụng.

5.24.3 Kiểm tra xác nhận

Hàng ngày, kiểm tra độ nghiêng của đầu kim phân phối bằng cách sử dụng chân không để cho nắp trượt sát với bề mặt kim phân phối. Nắp trượt cần phải song song và cách bề mặt thạch 1 mm.

Kiểu phân phối cần được kiểm tra bằng cách phân phối mực in có thể rửa sạch được. Kiểu phân phối dạng xoắn cần phân phối dày đặc nhất gần tâm đĩa khi sự lắng đọng bắt đầu và trở nên ít đậm đặc hơn ở điểm nhấc ra của kim phân phối. Phần rõ nhất của đĩa phải là tâm và có đường kính khoảng 2,0 cm.

Hàng ngày kiểm tra để đảm bảo rằng đầu kim phân phối ở độ nghiêng đúng so với bề mặt thạch bằng cách sử dụng nắp trượt và bộ phận định mức được cung cấp cùng với thiết bị.

Độ vô trùng của bộ phân phối dạng xoắn cần được kiểm tra bằng nước vô trùng đối với mỗi dây mẫu cần kiểm tra.

Kiểm tra khối lượng của thể tích phân phối cần được tiến hành định kỳ sử dụng nước cất. Khối lượng thu được cần nằm trong sai số tối đa cho phép $\pm 5\%$ khối lượng dự kiến đối với thể tích phân phối.

5.24.4 Bảo dưỡng

Khử trùng đường ống phân phối và kim phân phối bằng cách cho dung dịch chứa từ 0,5 % đến 1 % clo chảy qua. Sau đó cho nước vô trùng hoặc nước đã loại khoáng chảy qua đường ống.

Có thể ngăn ngừa vón cục bằng cách cho các hạt lắng xuống trước khi nạp huyền phù mẫu và sử dụng phần chất lỏng nổi phía trên.

Các cục vón cần được loại bỏ ngay và làm sạch dụng cụ.

Dụng cụ cần được bảo dưỡng và kiểm tra theo sử dụng.

5.25 Thiết bị chung cất, loại ion và thẩm thấu ngược

5.25.1 Mô tả

Các thiết bị này được dùng để tạo nước cất hoặc nước đã loại ion/loại khoáng có chất lượng yêu cầu (xem ISO/TS 11133) về chuẩn bị môi trường nuôi cấy vi sinh hoặc thuốc thử và cho các ứng dụng phòng thử nghiệm khác.

5.25.2 Sử dụng

Lắp đặt, vận hành và sử dụng thiết bị theo chỉ dẫn của nhà sản xuất, đúng theo vị trí của nước sử dụng, nước thải và hệ thống điện của phòng thử nghiệm.

5.25.3 Kiểm tra xác nhận

Nước phải được kiểm tra định kỳ hoặc khi đã dùng sau khi tích lũy tính dẫn điện và không được lớn hơn 25 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (tương đương với suất điện trở $\geq 40000 \Omega \cdot \text{cm}$) đối với việc chuẩn bị môi trường và thuốc thử.

Nếu nước được bảo quản trước khi sử dụng hoặc được tạo ra qua việc trao đổi ion thì cần tiến hành kiểm tra sự nhiễm bẩn vi khuẩn theo ISO/TS 11133.

5.25.4 Bảo dưỡng

Thiết bị chung cất cần được làm sạch và cạo sạch định kỳ với tần suất phụ thuộc vào độ cứng của nước sử dụng. Máy loại ion và thẩm thấu ngược cần được duy trì theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

5.26 Thiết bị hẹn giờ và tính giờ

5.26.1 Mô tả

Thiết bị hẹn giờ và tính giờ đầy đủ là các dụng cụ có thể chỉnh chính xác thời gian được sử dụng cho các phòng thử nghiệm khi thời gian được quy định và quyết định.

TCVN 6404:2008

5.26.2 Sử dụng

Các loại đồng hồ mốc chuẩn hoặc hiện số được dùng để kiểm soát thời gian thao tác (ví dụ: đưa các chủng vào màng vi khuẩn, đông hoá mẫu) phải trong tình trạng làm việc tốt và có thể có độ chính xác yêu cầu.

Vận hành các thiết bị tính thời gian trên thiết bị phòng thử nghiệm (ví dụ: nồi hấp áp lực, máy ly tâm, bộ đông hoá) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các thiết bị tính thời gian phải có độ chính xác yêu cầu.

5.26.3 Kiểm tra xác nhận

Kiểm tra tất cả đồng hồ dùng trong phòng thử nghiệm khi có dấu hiệu sai so với chuẩn quốc gia và sau khi sửa chữa.

5.26.4 Bảo dưỡng

Định kỳ làm sạch và kiểm tra thiết bị tính thời gian về hoạt động đúng.

Thiết bị tính thời gian phải được kiểm tra theo quy trình bảo dưỡng thiết bị.

5.27 Pipet và pipet tự động

5.27.1 Mô tả

Pipet là dụng cụ bằng thuỷ tinh hoặc chất dẻo sử dụng một lần được dùng để phân phối các thể tích chất lỏng hoặc vật liệu sánh; pipet chia độ phân phối các thể tích đã định với độ chính xác phụ thuộc vào quy định.

Pipet tự động (cơ học) được gắn đầu tip bằng chất dẻo để phân phối các thể tích cố định hoặc có thể điều chỉnh được của chất lỏng, hút bằng tay hoặc cơ học.

5.27.2 Sử dụng

Loại bỏ các pipet đã bị vỡ hoặc bị hỏng.

Pipet Pasteur hoặc pipet chia độ và đầu tip của pipet cần được đậy bằng bông không hấp thụ để tránh nhiễm bẩn khi dùng để phân phối dịch cấy vi khuẩn.

Không dùng miệng để hút pipet trong các thiết bị dùng cho vi sinh, trừ dịch lỏng không bị nhiễm bẩn.

Các bầu được sử dụng với pipet Pasteur hoặc chia độ và các đầu tip phải được chỉnh kích cỡ để tránh bị rò rỉ và đảm bảo làm việc có hiệu quả.

5.27.3 Kiểm tra xác nhận

Kiểm tra các pipet chia độ để đảm bảo phân phối đúng các thể tích nếu như nhà sản xuất không xác nhận độ đúng của chúng (độ đúng và độ chụm).

Hiệu chuẩn pipet theo TCVN 7150 (ISO 835) (tất cả các phần) và ISO 8655-1.

Kiểm tra các pipet mới trước khi sử dụng và định kỳ kiểm tra tùy thuộc vào tần suất và cách sử dụng để chắc chắn các sai số tối đa cho phép như trong ISO 8655-1. Tiến hành kiểm tra khối lượng trung gian sử dụng nước cất hoặc nước đã loại khoáng để đảm bảo rằng các thể tích được phân phối nằm trong khoảng sai số tối đa cho phép.

Kiểm tra các dây pipet mới được hiệu chuẩn.

5.27.4 Bảo dưỡng

Khử nhiễm và/hoặc khử trùng các pipet sử dụng nhiều lần và các pipet tự động một cách thích hợp sau khi sử dụng.

Nếu các ống hoặc pittông của pipet tự động bị nhiễm bẩn khi sử dụng thì tháo rời chúng để khử nhiễm và làm sạch. Sau khi lắp ráp lại, cần thực hiện hiệu chuẩn. Khi trong phòng thử nghiệm không thực hiện được điều này thì gửi các pipet tự động lại cho nhà sản xuất để lắp ráp lại và hiệu chuẩn lại.

5.28 Nhiệt kế và dụng cụ kiểm soát nhiệt độ, kể cả các máy ghi tự động

5.28.1 Mô tả

Nhiệt kế là các dụng cụ thủy tinh có chứa thủy ngân hoặc dạng thủy tinh chứa cồn được dùng để kiểm tra nhiệt độ trong suốt phạm vi hoạt động của phòng thử nghiệm.

Các dụng cụ kiểm soát nhiệt độ khác bao gồm các nhiệt điện trở platin và các thiết bị sử dụng cặp nhiệt điện để đo nhiệt độ và đọc sự dao động nhiệt độ theo thời gian và in ra giấy hoặc ghi bằng điện tử.

Các nhiệt kế đối chứng và dụng cụ kiểm soát nhiệt độ khác phải được hiệu chuẩn theo chuẩn quốc gia hoặc chuẩn quốc tế và được xác nhận điều đó. Chúng chỉ được dùng cho mục đích đối chứng và không được dùng cho việc kiểm soát hàng ngày.

Các nhiệt kế làm việc và các dụng cụ đo nhiệt độ khác phải được hiệu chuẩn theo cách sao cho có thể liên kết với chuẩn quốc gia hoặc chuẩn quốc tế.

Các dụng cụ có độ chính xác thích hợp phù hợp với chuẩn quốc gia hoặc chuẩn quốc tế có thể được sử dụng để làm nhiệt kế làm việc sau khi đã kiểm tra hiệu quả của chúng.

TCVN 6404:2008

5.28.2 Sử dụng

Các nhiệt kế làm việc và các dụng cụ đo nhiệt độ khác có thể đo được nhiệt độ yêu cầu trong dải sai số tối đa cho phép đã được quy định.

Độ không đảm bảo đo của dụng cụ kiểm soát nhiệt độ cần phải nhỏ hơn bốn lần dải sai số tối đa cho phép. Ví dụ: đối với sai số tối đa cho phép mục đích là $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ thì độ không đảm bảo đo phải là $\pm 0,25\text{ }^{\circ}\text{C}$; đối với sai số tối đa cho phép là $\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ thì độ không đảm bảo đo phải là $\pm 0,125\text{ }^{\circ}\text{C}$. Độ không đảm bảo đo của việc hiệu chuẩn nhiệt kế đối chứng cần được tính đến khi xác định nhiệt độ hoạt động.

Các nhiệt kế hoặc cặp nhiệt điện được đặt trong môi trường không khí của tủ ấm cần được giữ trong các vật chứa thích hợp được đổ đầy glyxerol, parafin lỏng hoặc glycol polypropylen để đệm chống mất nhiệt khi mở cửa và có số đọc thích hợp.

Sử dụng các nhiệt kế có bầu ngâm ngập hoàn toàn trong dung dịch.

Các nhiệt kế được đặt trong nôi cách thủy cần được ngập trong nước theo các quy định riêng, ví dụ: các nhiệt kế ngập một phần cần được để ngập ở độ sâu quy định cho loại nhiệt kế đó, ví dụ 76 mm hoặc 100 mm.

Không sử dụng các nhiệt kế có cột thủy ngân hoặc cồn đã vỡ.

Các nhiệt kế thủy ngân rất dễ vỡ, do đó nếu có nguy cơ bị vỡ thì chúng phải được đặt trong các hộp bảo vệ mà không làm ảnh hưởng đến phép đo nhiệt độ.

CẢNH BÁO – Thủy ngân rất độc đối với con người. Loại bỏ theo quy định của quốc gia.

5.28.3 Kiểm tra xác nhận

Các nhiệt kế đối chứng phải được hiệu chuẩn thông qua toàn bộ dải chuẩn quốc gia hoặc quốc tế trước khi sử dụng lần đầu và ít nhất 5 năm một lần. Hiệu chuẩn một điểm trung gian (ví dụ: điểm băng) cần được thực hiện để kiểm tra hiệu quả thực hiện.

Các cặp nhiệt điện đối chứng phải được hiệu chuẩn toàn bộ theo chuẩn quốc gia hoặc quốc tế trước khi sử dụng lần đầu và thực hiện theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Việc kiểm tra trung gian phải được thực hiện theo nhiệt kế đối chứng để kiểm tra hiệu quả thực hiện.

Các dụng cụ đo nhiệt độ khác (ví dụ: bộ tiếp nhận sóng radio) cần được hiệu chuẩn theo chuẩn quốc gia hoặc quốc tế trước theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Các nhiệt kế làm việc và cặp nhiệt điện được kiểm tra tại điểm đóng băng và/hoặc theo nhiệt kế đối chứng trong dải nhiệt độ làm việc.

5.28.4 Bảo dưỡng

Duy trì các nhiệt kế và các cặp nhiệt điện sạch và trong tình trạng tốt.

Duy trì các dụng cụ đo nhiệt độ khác theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

5.29 Máy tách từ miễn dịch

5.29.1 Mô tả

Thiết bị này được sử dụng để tách và cô đặc các vi sinh vật mục tiêu trong các dịch cấy lỏng bằng các hạt thuận từ được phủ bởi kháng thể thích hợp.

Máy tách thủ công gồm có máy trộn quay với tốc độ từ 12 r/min đến 20 r/min và một bộ cô đặc hạt với thanh từ có thể tháo rời.

Bộ tách tự động sử dụng các dàn lọc của các que từ và các máng để ống. Các hạt từ được chuyển động từ ống này đến ống khác và cho phép quá trình tách toàn bộ, gồm các giai đoạn rửa, cần được thực hiện tự động trong môi trường kín.

5.29.2 Sử dụng và kiểm tra

Sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất và theo các chỉ dẫn trong các tiêu chuẩn cụ thể (ví dụ: đối với *E.coli* O157).

Đối với các hệ thống thủ công thì kiểm tra tốc độ của máy trộn.

Đối với các hệ thống thủ công và tự động, kiểm tra rằng hệ thống đã có thể phân lập các mức thấp của vi sinh vật mục tiêu hay chưa trước khi đưa vào sử dụng bình thường.

Điều quan trọng là đánh giá khả năng nhiễm bẩn chéo trong suốt quá trình thao tác tách thủ công và thực hiện các bước thích hợp để tránh xảy ra sự nhiễm bẩn chéo.

5.29.3 Bảo dưỡng

Kiểm tra và duy trì thiết bị theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

5.30 Hệ thống lọc

Sử dụng hệ thống lọc theo ISO 8199.

5.31 Các thiết bị khác và phần mềm

Các thiết bị khác và phần mềm đi kèm phải có thể đạt được độ chính xác yêu cầu và phải phù hợp với các quy định liên quan đến các phép thử có liên quan. Các chương trình hiệu chuẩn phải được thiết lập cho các lượng và các giá trị chính khi các đặc tính này có ảnh hưởng đến kết quả. Trước khi sử dụng

TCVN 6404:2008

thông thường, hiệu chuẩn và kiểm tra thiết bị để chứng minh rằng thiết bị đã đáp ứng được các yêu cầu của phòng thử nghiệm và đáp ứng các yêu cầu của tiêu chuẩn có liên quan. Mọi thay đổi hoặc cấu hình lại về phần mềm của phòng thử nghiệm phải được kiểm tra xác nhận để đảm bảo phần mềm đã sửa đổi cho kết quả đúng.

6 Chuẩn bị dụng cụ thủy tinh và các vật liệu của phòng thử nghiệm

6.1 Chuẩn bị

Dụng cụ thủy tinh và các vật liệu khác để sử dụng trong thử nghiệm vi sinh phải có thiết kế phù hợp, được sử dụng đúng và được chuẩn bị đảm bảo được độ sạch và/hoặc vô trùng cho đến khi sử dụng.

Dụng cụ thủy tinh và các vật liệu khác được thiết kế ngăn ngừa hoặc hạn chế sự tiếp xúc giữa người thực hiện và vật liệu lây nhiễm.

Các ống nghiệm và chai lọ phải đậy kín được bằng cách thích hợp. Nếu cần, dụng cụ cần khử trùng (ví dụ như pipet) cần được đặt trong các hộp chuyên dụng hoặc được gói trong chất liệu thích hợp (giấy chuyên dụng, giấy nhôm...). Dụng cụ thủy tinh cần hấp phải hở sao cho luồng hơi nước có thể xuyên qua để đạt được hiệu quả khử trùng.

6.2 Khử trùng/khử nhiễm

6.2.1 Yêu cầu chung

Nhiệt độ và thời gian khử trùng/khử nhiễm cần được ghi lại. Các chỉ thị khử trùng có thể được sử dụng để phân biệt giữa các vật liệu đã khử trùng và chưa khử trùng.

6.2.2 Khử trùng bằng nhiệt khô

Đặt các dụng cụ thủy tinh v.v... trong tủ khử trùng ít nhất 1 h ở nhiệt độ 170 °C hoặc tương đương.

6.2.3 Khử trùng bằng nhiệt ẩm (hơi nước)

Hơi ẩm chịu áp lực là phương pháp hiệu quả nhất để khử trùng dụng cụ thủy tinh và vật liệu của phòng thử nghiệm. Nhiệt độ buồng áp lực phải được duy trì ở 121 °C ít nhất 15 min (xem 5.6).

6.2.4 Khử nhiễm bằng hoá chất

Sử dụng các hợp chất hoá học (ví dụ: các sản phẩm chứa clo, cồn, các muối amoni bậc bốn) với các nồng độ thích hợp và trong một khoảng thời gian tiếp xúc thích hợp.

Đảm bảo rằng các dư lượng hoá chất không ảnh hưởng đến sự thu hồi vi sinh vật.

6.3 Dụng cụ sử dụng một lần

Có thể dùng dụng cụ sử dụng một lần thay cho dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần (dụng cụ thủy tinh, đĩa petri, pipet, chai lọ, ống nghiệm, que đùn mẫu ...), nếu có chất lượng tương đương.

Nên kiểm tra xác nhận tính phù hợp của các dụng cụ đó cho mục đích vi sinh vật (đặc biệt là độ vô trùng) và rằng nguyên liệu đó không chứa các chất ức chế sự phát triển của vi sinh vật (xem ISO 9998).

6.4 Bảo quản dụng cụ thủy tinh sạch và vật liệu

Trong suốt quá trình bảo quản, dụng cụ sạch phải được bảo vệ tránh bụi, đảm bảo được độ sạch.

6.5 Quản lý dụng cụ thủy tinh vô trùng và vật liệu

Dụng cụ thủy tinh và vật liệu phải được bảo quản trong các điều kiện giữ được độ vô trùng. Dụng cụ thủy tinh sử dụng một lần phải được bảo quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất, không được làm hỏng bao bì. Dụng cụ đã chuẩn bị cho thử nghiệm phải được bảo quản trong các vật chứa sạch.

Khi khử trùng các dụng cụ cho vi sinh, thời hạn sử dụng (hoặc ngày sản xuất) phải ghi ngay trên mỗi bao bì.

6.6 Khử nhiễm và khử trùng

6.6.1 Khử nhiễm dụng cụ sử dụng một lần

Khử nhiễm các dụng cụ sử dụng một lần trước khi loại bỏ.

Bên cạnh các phương pháp quy định trong điều này, có thể dùng phương pháp nung. Nếu không có sẵn lò nung thì việc khử nhiễm và loại bỏ có thể thực hiện riêng rẽ.

6.6.2 Khử nhiễm dụng cụ sử dụng một lần

Thông thường, dụng cụ được khử trùng bằng nhiệt ẩm (xem 6.2.3) hoặc nhiệt khô (xem 6.2.2).

Trong các trường hợp cụ thể (ví dụ như lấy mẫu ngoài ruộng), thì khử nhiễm bằng hóa chất có thể thích hợp. Sau khi xử lý như thế, dụng cụ không được chứa các chất gây ức chế.

6.6.3 Khử nhiễm dụng cụ thủy tinh và vật liệu sau khi sử dụng

Vật liệu cần khử nhiễm và loại bỏ phải được đặt trong các vật chứa, ví dụ như túi chất dẻo có thể hấp áp lực được. Hấp áp lực là phương pháp tốt cho mọi quá trình khử nhiễm (ít nhất 30 min ở 121 °C). Nồi hấp áp lực phải được nạp sản phẩm sao cho nhiệt có thể phân bố đều (ví dụ: không quá đầy) và chú ý nói lỏng nắp/đậy và mở túi.

TCVN 6404:2008

Có thể sử dụng các phương pháp thay thế cho các nổi hấp áp lực nếu quy định quốc gia cho phép.

Hấp áp lực tất cả các dụng cụ đã tiếp xúc với dịch cấy vi sinh (môi trường nuôi cấy lỏng hoặc đặc) gồm cả vật chứa sử dụng nhiều lần trước khi rửa.

Trong quá trình kiểm tra, khử nhiễm bằng cách ngâm trong chất tẩy rửa pha loãng mới chuẩn bị các dụng cụ chống ăn mòn và có kích thước nhỏ (ví dụ như pipet).

Các pipet Pasteur chỉ được sử dụng một lần.

Phần lớn các chất tẩy rửa (xem Phụ lục A) đều có các ảnh hưởng xấu đến người thực hiện. Mang găng tay và kính bảo vệ mắt khi xử lý với thuốc thử đậm đặc.

6.7 Quản lý chất thải

Thải bỏ đúng các vật liệu đã bị nhiễm bẩn không làm ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng phân tích mẫu, đó là vấn đề quản lý phòng thử nghiệm tốt.

Cần tuân thủ các quy định quốc gia về an toàn và sức khỏe hoặc môi trường.

Hệ thống nhận dạng và tách riêng vật liệu đã nhiễm bẩn và các vật chứa của chúng phải được thiết lập cho:

- vật liệu không bị nhiễm bẩn (ví dụ: các mẫu thực phẩm chưa cấy) mà có thể được thải bỏ với chất thải thông thường,
- dao mổ, kim cấy, dao, thủy tinh bị vỡ,
- vật liệu bị nhiễm bẩn cần hấp áp lực và quay vòng và
- vật liệu bị nhiễm bẩn cần hấp áp lực hoặc để thải bỏ nếu vật liệu đó phải nung (tuy nhiên, xem các yêu cầu đặc biệt đối với vi sinh vật thuộc nguy cơ cấp 3 dưới đây).

Việc nung vật liệu đã bị nhiễm bẩn và các vật chứa của chúng cần được thực hiện theo quy định quốc gia về an toàn và sức khỏe hoặc môi trường.

Các vật liệu bị nhiễm bẩn với vi sinh vật thuộc nguy cơ cấp 3 và các vật chứa của chúng phải được hấp áp lực trước khi đưa vào nung.

6.8 Rửa

Chỉ rửa dụng cụ sử dụng nhiều lần sau khi đã khử nhiễm. Sau khi rửa, tráng tất cả dụng cụ bằng nước đã loại ion.

Các dụng cụ chuyên dụng có thể được dùng để hỗ trợ việc làm sạch (ví dụ: máy rửa pipet, máy rửa đĩa, máy siêu âm).

Sau khi rửa, dụng cụ sử dụng nhiều lần không được chứa các dư lượng mà có thể ảnh hưởng đến sự phát triển tiếp theo của vi sinh vật.

7 Chuẩn bị và khử trùng môi trường nuôi cấy

Chuẩn bị và khử trùng môi trường nuôi cấy theo ISO/TS 11133-1 và ISO/TS 11133-2.

8 Mẫu phòng thử nghiệm

8.1 Lấy mẫu

8.1.1 Yêu cầu chung

Việc lấy mẫu là rất quan trọng, nhưng việc lấy mẫu và các phương án lấy mẫu không phải là một phần của tiêu chuẩn này. Điều quan trọng là phòng thử nghiệm phải nhận được đúng mẫu đại diện của sản phẩm và không bị hư hỏng hoặc bị thay đổi trong suốt quá trình vận chuyển và bảo quản.

Mẫu phải được bảo vệ tránh bị nhiễm bẩn từ bên ngoài như không khí, vật chứa mẫu, dụng cụ lấy mẫu được dùng và xử lý đúng cách. Vật chứa mẫu không được đầy quá ba phần tư để tránh rò rỉ và để trộn được dễ dàng trong phòng thử nghiệm.

Nhận dạng các mẫu rõ ràng và toàn diện, ghi lại thông tin về mẫu.

Thường xuyên ghi lại nhiệt độ tại thời điểm thu thập mẫu và nhận mẫu, việc này giúp cho phòng thử nghiệm trong việc diễn giải kết quả.

Mẫu cần được gửi trong vật chứa nguyên vẹn chưa mở.

Nếu sản phẩm ở dạng dễ rời hoặc đựng trong vật chứa lớn gửi đến phòng thử nghiệm, thì chuyển từng phần một cách vô trùng sang vật chứa mẫu vô trùng.

Vật chứa mẫu vô trùng cần được mở chỉ trong một khoảng thời gian đủ để chuyển mẫu và được đóng lại ngay sau đó.

8.1.2 Phương án lấy mẫu

Lấy mẫu không phải là một phần của tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn cụ thể đối với sản phẩm liên quan, nếu có sẵn.

8.2 Vận chuyển

Việc vận chuyển mẫu tới phòng thử nghiệm phải đảm bảo giữ được mẫu không bị biến đổi do sự có mặt các vi sinh vật.

TCVN 6404:2008

Tốt nhất là nên vận chuyển mẫu tới phòng thử nghiệm bằng phương pháp nhanh nhất.

Mẫu được bao gói sao cho tránh được rò rỉ hoặc vỡ.

Trên nhãn sản phẩm phải chỉ rõ có cần bảo quản lạnh hay không.

Các mẫu không cần bảo quản lạnh hoặc đông lạnh cần được đóng gói trong vật chứa sử dụng vật liệu bao gói thích hợp để tránh bị vỡ.

Không sử dụng đá vụn vì có thể làm nhiễm bẩn sản phẩm nếu vật chứa bị vỡ hoặc bị rò rỉ.

Nếu không được quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể, thì nhiệt độ trong quá trình vận chuyển được khuyến cáo như sau, [ví dụ: TCVN 6507 (ISO 6887) và TCVN 6263 (ISO 8261)]:

- sản phẩm "không dễ phân huỷ": nhiệt độ phòng (dưới 40 °C);
- sản phẩm đông lạnh và đông lạnh sâu: dưới -15 °C, tốt nhất là dưới -18 °C;
- các sản phẩm khác dễ phân huỷ ở nhiệt độ môi trường: từ 1 °C đến 8 °C;
- các mẫu tầm bông, xem ISO 18593 và ISO 17604.

Khi không quy định các điều kiện thì các bên nên thoả thuận về thời gian và nhiệt độ vận chuyển.

8.3 Tiếp nhận

Kiểm tra trạng thái của mẫu khi tiếp nhận.

Nếu trạng thái không đảm bảo hoặc nếu mẫu không đủ, thông thường phòng thử nghiệm không được nhận mẫu đó.

Trong trường hợp đặc biệt, nhân viên phòng thử nghiệm có thể phân tích sau khi đã thoả thuận và thống nhất với khách hàng.

Tuy nhiên, báo cáo thử nghiệm phải bao gồm dự đoán trước về tính hiệu lực của các kết quả.

Mẫu được nhận vào phòng thử nghiệm phải được ghi chép đầy đủ sao cho có thể kiểm soát được suốt quá trình cho đến khi viết báo cáo thử nghiệm. Việc nhận dạng và mã hoá các mẫu và báo cáo phải đảm bảo việc truy nguyên cho tất cả các giai đoạn trong phòng thử nghiệm.

Bề mặt bên ngoài vật chứa cần được khử trùng bằng chất tẩy rửa thích hợp, nếu cần.

Kiểm tra các vật chứa mẫu về các khuyết tật vật lý.

Các thông tin sau cần phải ghi:

- ngày (và thời gian, nếu liên quan) nhận mẫu;
- chi tiết việc lấy mẫu (ngày và thời gian lấy mẫu, các điều kiện lấy mẫu);
- tên và địa chỉ của bên yêu cầu;

Khi tiếp nhận các mẫu dễ hỏng, thì ghi lại nhiệt độ vận chuyển hoặc nhiệt độ mẫu mô phỏng dùng cho mục đích này.

Kiểm tra mẫu càng sớm càng tốt sau khi nhận được, tốt nhất là trong vòng 24 h, hoặc theo sự thoả thuận của các bên có liên quan.

Đối với các sản phẩm rất dễ bị hỏng (như động vật có vỏ), thì kiểm tra trong vòng 24 h sau khi lấy mẫu. Đối với các mẫu dễ hỏng (như cá, sữa nguyên liệu) thì kiểm tra trong vòng 36 h.

Nếu thời hạn cuối cùng thử nghiệm đề cập ở trên không thực hiện được thì làm đông lạnh mẫu ở nhiệt độ dưới $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, tốt nhất là $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, với điều kiện là các vi sinh vật mục tiêu không thay đổi nhiều so với chất nền của mẫu có liên quan.

8.4 Bảo quản

Các mẫu chờ kiểm tra phải được bảo quản ở các điều kiện không làm thay đổi số lượng vi sinh vật có trong mẫu.

Nhiệt độ bảo quản được khuyến cáo như sau:

- sản phẩm không dễ phân huỷ: nhiệt độ môi trường (từ $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $27\text{ }^{\circ}\text{C}$);
- sản phẩm đông lạnh và đông lạnh sâu: dưới $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, tốt nhất là dưới $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- các sản phẩm khác dễ phân huỷ ở nhiệt độ môi trường, kể cả thực phẩm bị hỏng: từ $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ [xem TCVN 6507-2 (ISO 6887-2) đến TCVN 6507-4 (ISO 6887-4) hoặc TCVN 6263 (ISO 8261)];
- các mẫu tằm bông, xem ISO 18593 và TCVN 7925:2008 (ISO 17604:2003).

8.5 Phần mẫu thử

8.5.1 Nguyên tắc cụ thể để lấy các phần mẫu thử

Xem các phần liên quan của TCVN 6507 (ISO 6887) hoặc TCVN 6263 (ISO 8261) về các nguyên tắc cụ thể về lấy phần mẫu thử và chuẩn bị huyền phù ban đầu.

TCVN 6404:2008

8.5.2 Bảo quản và phân huỷ các mẫu phòng thử nghiệm

Ngoại trừ các trường hợp đặc biệt, giữ các mẫu phòng thử nghiệm cho đến khi thu được tất cả các kết quả, hoặc lâu hơn, đóng gói mẫu trong các vật chứa vô trùng (ví dụ, bao gói bằng chất dẻo) và bảo quản chúng ở nhiệt độ bảo quản ban đầu.

Các mẫu dễ bị hỏng cần được làm đông lạnh.

CHÚ THÍCH Thường không chấp nhận việc thử lại mẫu, vì các khả năng thay đổi trạng thái của vi khuẩn.

9 Kiểm tra

9.1 Các biện pháp để phòng về mặt vệ sinh trong quá trình kiểm tra

Để tránh bị nhiễm bẩn môi trường và các phần mẫu thử, việc xử lý các sản phẩm dạng bột (khô) cần tiến hành trong phòng riêng biệt hoặc nơi riêng biệt hoặc trong tủ bảo vệ.

Trước khi mở các mẫu, lau sạch quanh vùng định mở bằng cồn 70 % (phần thể tích) (hoặc sản phẩm tương tự khác) và để cho bay hơi đến khô. Trước khi mở bao gói vô trùng, ngâm vùng định mở trong dung dịch chứa 100 ppm đến 200 ppm clo tự do (hoặc chất tẩy trùng thích hợp khác) ít nhất 10 min để diệt vi sinh vật có thể làm nhiễm bẩn mẫu.

Tất cả các dụng cụ dùng để mở bao gói và lấy tất cả mẫu hoặc từng phần mẫu (cái mở bằng thiếc, kéo, thìa, kẹp, pipet v.v...) phải vô trùng.

Xung quanh vùng làm việc phải được làm sạch và được lau bằng dung dịch tẩy rửa thích hợp trước khi thử nghiệm.

Cần rửa tay ngay trước khi bắt đầu thử nghiệm và trong quá trình thử nghiệm nếu bị nhiễm bẩn.

Tất cả các dụng cụ được sử dụng phải vô trùng và được bảo vệ khỏi sự nhiễm bẩn trước và trong khi sử dụng.

Tất cả các thiết bị và dụng cụ được sử dụng cần đặt trong vật chứa thích hợp để loại bỏ hoặc khử trùng.

Chú ý tiến hành công việc trong các điều kiện vô trùng, ví dụ như :

a) đảm bảo rằng khu vực làm việc sạch, tất cả các nguồn có khả năng gây nhiễm bẩn phải được loại bỏ hoặc giảm đến mức tối thiểu và không có gió lùa (cửa chính và cửa sổ phải đóng lại) và tránh người qua lại trong khi thử nghiệm;

b) trước và sau khi làm việc, khử nhiễm bề mặt thao tác bằng chất sát trùng thích hợp;

- c) đảm bảo rằng trước khi bắt đầu tiến hành công việc tất cả các thứ cần thiết đã được chuẩn bị sẵn;
- d) thực hiện phân tích ngay;
- e) tách riêng các hoạt động "sạch" và "bẩn" theo thời gian hoặc vị trí (điều này rất quan trọng với các mẫu có nguy cơ cao như thịt nguyên liệu và trứng nguyên liệu);
- f) dùng dụng cụ sử dụng một lần;
- g) nếu toàn bộ lượng chứa trong bao gói được lấy bằng pipet sử dụng một lần, đĩa petri v.v...không được sử dụng trong quá trình kiểm tra thì đảm bảo rằng bao gói được đóng kín sau khi lấy một lượng cần thiết;
- h) lau sạch ngay mọi rò rỉ bằng khăn bông hoặc vật liệu thích hợp khác tẩm cồn 70 % (thể tích) hoặc chất tẩy trùng ¹⁾ thích hợp khác rồi làm sạch và khử nhiễm bề mặt làm việc trước khi tiếp tục;
- i) sử dụng tủ an toàn để xử lý các sản phẩm chứa các vi khuẩn gây bệnh, nếu quy định quốc gia yêu cầu;
- j) khi lấy pipet vô trùng ra khỏi hộp, không để đầu tip chạm vào các bề mặt bên ngoài của các pipet còn lại trong hộp vì các bề mặt đó sẽ gây nhiễm bẩn;
- k) không để pipet tiếp xúc với nắp hoặc cổ của chai đựng dung dịch;

Sol khí có thể là nguyên nhân chính gây nhiễm bẩn môi trường và lây nhiễm. Sol khí có thể hình thành qua việc:

- khi mở các đĩa petri, ống nghiệm và chai;
- khi sử dụng bộ lắc, xyranh, máy ly tâm .v.v...;
- khi làm rỗng pipet;
- khi khử trùng vòng cấy hoặc kim cấy ướt;
- khi mở ống chứa dịch cấy đông khô.

Do đó phải tối thiểu hoá việc hình thành sol khí.

Đối với các phương pháp phân tử, cần lưu ý tới các phòng ngừa theo ISO 22174.

¹⁾ Khi khử nhiễm sử dụng cồn quá 70 % (thể tích) thì cần có thời gian tiếp xúc thích hợp theo chỉ dẫn của nhà sản xuất, để đạt được hiệu quả khử nhiễm.

TCVN 6404:2008

9.2 Chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng

9.2.1 Yêu cầu chung

Chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng theo phần tương ứng của TCVN 6507 (ISO 6887) hoặc TCVN 6263 (ISO 8261). Thời gian từ khi kết thúc việc chuẩn bị đến khi cấy vào môi trường nuôi cấy không được vượt quá 45 min, trừ khi có qui định riêng trong tiêu chuẩn tương ứng.

Các bước chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng có thể cần trải qua bước tăng sinh theo quy định trong tiêu chuẩn cụ thể.

9.2.2 Cô đặc

9.2.2.1 Ly tâm hoặc lọc màng

Nếu cần định lượng số lượng nhỏ các vi sinh vật thì có thể cải tiến việc định lượng về độ nhạy và độ chụm bằng cách tạo ra bước cô đặc phần mẫu thử. Có thể thực hiện bước này bằng cách ly tâm hoặc lọc màng.

Nếu dùng máy ly tâm thì hoà tan chất lắng đã ly tâm trong một thể tích xác định của dịch pha loãng và tiếp tục bước phân tích.

Đối với mỗi tổ hợp (thực phẩm với vi sinh vật) được xem xét, cần nghiên cứu (xem [23]) trước để chứng minh rằng bước tăng sinh có cần thiết hay không và đánh giá hiệu lực của bước này. Khả năng lọc của huyền phù thực phẩm cũng phải được đánh giá.

Hiệu quả tổng thể của phương pháp nói về độ nhạy, tính chọn lọc, độ tuyến tính và độ lặp lại cần được kiểm tra. Nếu mức độ nhiễm chưa được biết thì cần thực hiện đồng thời phương pháp chuẩn (không lọc).

9.2.2.2 Tách miễn dịch

Nếu trong mẫu có mặt một số lượng nhỏ các vi sinh vật mục tiêu, thì tách và cô đặc các vi sinh vật này bằng các hạt từ miễn dịch có phủ các kháng thể đặc hiệu.

Dàn đều các hạt cùng với các vi sinh vật mục tiêu bắt được, trực tiếp lên thạch đặc đặc hiệu theo các tiêu chuẩn đặc thù. Tuy nhiên, kiểm tra xác nhận cho thấy rằng các hạt từ miễn dịch đã được phủ các kháng thể đặc hiệu cho bước cô đặc này là thích hợp, như được đánh giá bằng các nghiên cứu đã xuất bản trong tài liệu khoa học quốc tế, liên quan đến vi sinh vật trong thực phẩm. Việc kiểm tra này rất quan trọng nếu quy trình này chưa được đánh giá theo ISO 16140.

10 Định lượng

10.1 Yêu cầu chung

Khi cần đánh giá chất lượng vi sinh vật và/hoặc độ an toàn của thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, thông thường không đủ chỉ để biết những vi sinh vật nào có mặt. Trong nhiều trường hợp, việc định lượng rất quan trọng, điều này cần phải đếm các vi sinh vật có mặt. Có thể thực hiện định lượng bằng nhiều cách: phương pháp trực tiếp (dùng kính hiển vi), bằng cách cấy lên môi trường đặc hoặc lỏng, đếm lưu lượng tế bào, phản ứng chuỗi polymeraza tức thời v.v.. Tuy nhiên, tiêu chuẩn này sẽ chỉ bao gồm việc định lượng sử dụng môi trường đặc và lỏng.

Việc định lượng sử dụng môi trường đặc được dựa trên khả năng của nhiều vi sinh vật sinh khuẩn lạc trong hoặc trên môi trường thạch mà có thể phát hiện được bằng mắt thường hoặc bằng kính khuếch đại. Tuy nhiên, nếu các chất nền chứa nhiều chất hạt thì có khả năng gây nhiễu việc phát hiện các khuẩn lạc, hoặc nếu mức khuẩn lạc là quá thấp, thì không sử dụng được nguyên tắc này mà không có bước tách trước các vi sinh vật mục tiêu ra khỏi chất nền (ví dụ bằng cách lọc hoặc tách miễn dịch). Trong các trường hợp đó, việc định lượng dùng môi trường lỏng là phương pháp lựa chọn thích hợp.

10.2 Định lượng sử dụng môi trường đặc

10.2.1 Yêu cầu chung

Đĩa petri cần được dán nhãn với số lượng mẫu, độ pha loãng, ngày tháng và mọi thông tin cần thiết khác.

Các dung dịch pha loãng phải được chọn sao cho thu được các đĩa chứa một lượng thích hợp các khuẩn lạc (xem 10.3.1) và khắc phục được mọi ức chế.

Sử dụng các pipet vô trùng riêng biệt để chuyển từ mỗi độ pha loãng, ngoại trừ nếu thực hiện từ độ pha loãng cao nhất đến độ pha loãng thấp nhất.

10.2.2 Số lượng đĩa petri cho mỗi độ pha loãng

Đối với các kỹ thuật định lượng vi sinh vật trong thực phẩm, phải sử dụng một đĩa cho mỗi độ pha loãng với ít nhất hai độ pha loãng liên tiếp, đối với các phòng thử nghiệm có hệ thống đảm bảo chất lượng theo TCVN ISO 17025. Nếu chỉ thực hiện trên một độ pha loãng hoặc nếu phòng thử nghiệm không có hệ thống đảm bảo chất lượng thì phải sử dụng hai đĩa theo ISO 8199.

10.2.3 Kỹ thuật đổ đĩa

10.2.3.1 Yêu cầu chung

Lấy các thể tích xác định của dung dịch pha loãng, chạm đầu tip của pipet vào thành ống để loại bỏ lượng chất lỏng dư dính vào phía ngoài. Nhấc nắp đĩa Pipet chỉ đủ cao để đưa pipet vào để phân phối

TCVN 6404:2008

các lượng cần thiết. Rót môi trường thạch tan chảy ở nhiệt độ 44 °C đến 47 °C vào mỗi đĩa petri²⁾. Tránh rót môi trường thạch tan chảy trực tiếp lên chủng cấy. Trộn ngay môi trường tan chảy với chủng cấy thật kỹ để thu được sự phân bố đồng đều các vi sinh vật trong môi trường. Để nguội và để cho đông đặc bằng cách đặt đĩa petri trên mặt phẳng nằm ngang, mát (thời gian đông đặc của thạch không được quá 10 min).

Sau khi lấy môi trường thạch ra từ nồi cách thủy, thấm khô chai bằng khăn sạch để ngăn ngừa nước nhiễm bẩn đĩa. Tránh làm đổ môi trường ra phía ngoài vật chứa hoặc trên nắp đĩa khi rót.

Để làm được điều này cần giữ chai ở tư thế nằm ngang hoặc giữ yên chai giữa các lần rót.

Nếu nghi ngờ có mặt các khuẩn lạc lan (ví dụ: *Proteus* spp.) trong sản phẩm cần xác định thì phủ lên các đĩa thạch đã đông đặc một lớp thạch không dinh dưỡng vô trùng hoặc thạch giống như môi trường cấy được dùng trong phép thử³⁾, để ngăn ngừa hoặc hạn chế sự mọc lan.

10.2.4 Cấy bề mặt

10.2.4.1 Yêu cầu chung

Các phương pháp cấy bề mặt đĩa được thiết kế để tạo ra chỉ các khuẩn lạc bề mặt trên các đĩa thạch có các ưu điểm nhất định so với phương pháp đổ đĩa. Hình thái của các khuẩn lạc bề mặt được quan sát dễ dàng, cải thiện khả năng của người phân tích về phân biệt giữa các loài khuẩn lạc khác nhau.

Các vi sinh vật không tiếp xúc với nhiệt của môi trường thạch tan chảy, nên có thể thu được các số đếm cao hơn.

Sử dụng các đĩa đã rót trước có độ dày môi trường thạch ít nhất là 3 mm, bằng phẳng và không chứa các bọt khí và không bị ẩm bề mặt.

Để thuận tiện cho việc dàn đều, bề mặt môi trường thạch đông đặc cần được làm khô theo ISO 11133 hoặc theo quy định của tiêu chuẩn có liên quan sao cho dịch cấy hấp thụ được trong vòng 15 min.

10.2.4.2 Phương pháp dàn bằng que dàn mẫu

Dùng pipet vô trùng, chuyển dịch cấy (thường là 0,1 ml hoặc 0,5 ml) mẫu thử dạng lỏng hoặc huyền phù ban đầu nếu sản phẩm ở dạng khác, vào đĩa thạch (đường kính 90 mm hoặc 140 mm, tương ứng). Lặp lại bước này cho dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo (các khuẩn lạc cần đếm sẽ có mặt trong dung dịch 10⁻¹ trong trường hợp mẫu ở dạng lỏng và dung dịch 10⁻² trong trường hợp mẫu ở dạng khác) và lặp lại với các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo, nếu cần.

²⁾ Thường từ 18 ml đến 20 ml cho đĩa petri 90 mm, để thu được độ dày tối thiểu là 3 mm.

³⁾ Thường là 5 ml cho đĩa petri 90 mm.

Nếu cần phát hiện các số đếm nhỏ các vi khuẩn trong trường hợp của các sản phẩm cụ thể, thì giới hạn phát hiện có thể tăng lên 10 lần bằng cách phân tích 1,0 ml mẫu đối với sản phẩm ở dạng lỏng và 1,0 ml huyền phù ban đầu đối với các sản phẩm ở dạng khác. Đối với mục đích này, dàn đều 1,0 ml dịch cấy lên khắp bề mặt của một đĩa petri cỡ lớn (đường kính 140 mm) hoặc ba đĩa petri cỡ nhỏ (đường kính 90 mm).

Dùng que dàn mẫu bằng thủy tinh, chất dẻo hoặc thép (ví dụ làm bằng đĩa thủy tinh và được tạo hình giống như gậy đánh hockey đường kính khoảng 3,5 mm và dài 20 cm, một đầu được uốn cong một đoạn dài khoảng 3 cm và được làm dẹt ở đầu cuối bằng cách đốt nóng), dàn dịch cấy càng nhanh càng tốt trên khắp bề mặt thạch mà không chạm vào thành của đĩa petri. Đậy nắp đĩa và để cho dịch cấy hấp thụ trong 15 min ở nhiệt độ phòng.

Trong các trường hợp cụ thể (được nêu trong tiêu chuẩn có liên quan) thì dịch cấy có thể lắng đọng trên màng rồi dàn đều như mô tả ở trên.

10.2.4.3 Phương pháp đổ đĩa dạng xoắn

10.2.4.3.1 Yêu cầu chung

Phương pháp đổ đĩa dạng xoắn được dùng để xác định mức vi sinh vật đã được xác định trong các thử nghiệm liên phòng với sữa và các sản phẩm sữa và các loại thực phẩm khác.

Thiết bị, dụng cụ được sử dụng: bộ phận đổ đĩa dạng xoắn được mô tả trong 5.24.

10.2.4.3.2 Chuẩn bị đĩa thạch

Dùng bộ phận phân phối tự động có hệ thống phân phối vô trùng được khuyến cáo sử dụng để chuẩn bị các đĩa thạch, để đảm bảo rằng các đĩa thạch đã bằng phẳng.

Rót cùng một lượng thạch vào tất cả các đĩa sao cho chiều cao thạch như nhau sẽ có trong kim của bộ phận đổ đĩa dạng xoắn để duy trì góc tiếp xúc chính xác.

Cách khác, có thể sử dụng các đĩa thạch đã chuẩn bị sẵn có bán trên thị trường.

10.2.4.3.3 Quy trình đổ đĩa và đếm

Khử nhiễm đầu tip của kim và đường ống bằng cách cho dung dịch natri hypoclorit (xem 5.24.4) sau đó cho nước vô trùng chảy qua hệ thống trước khi lấy mẫu dạng lỏng vào kim.

Đặt đĩa thạch rót trước vào đĩa petri trên bàn xoay và hạ thấp kim quay. Mẫu được phân phối đều theo đầu tip của kim lướt trên bề mặt đĩa thạch quay. Lấy đĩa thạch đã cấy ra và quay kim theo vị trí bắt đầu của nó. Khử nhiễm kim và nạp dịch cấy cho đĩa khác.

TCVN 6404:2008

Sau khi ủ ấm, đặt ô đếm đĩa dạng xoắn vào chính giữa. Sử dụng quy tắc đếm 20 cho các số đếm. Chọn góc bất kỳ và bắt đầu đếm khuẩn lạc từ cạnh ngoài của đoạn thứ nhất hướng tới tâm cho đến khi đếm được 20 khuẩn lạc. Hoàn thành việc đếm các khuẩn lạc còn lại trên đoạn chứa khuẩn lạc thứ hai mươi. Đếm trên các diện tích tương ứng trên mặt đối diện của đĩa và chia số khuẩn lạc đếm được trên hai mặt cho thể tích mẫu đã được đặt vào hai vùng này. Các thể tích mẫu liên quan đến một phần của ô đếm được nêu trong số tay thao tác đi kèm theo mỗi bộ phận đồ đĩa dạng xoắn.

10.2.5 Ủ ấm

Khi không có qui định nào khác, lật ngược ngay các đĩa đã cấy mẫu và đặt thật nhanh vào tủ ấm đã đạt nhiệt độ thích hợp. Nếu xảy ra sự mất nước nhiều (ví dụ, ở nhiệt độ 55 °C hoặc lưu thông không khí mạnh), gói các đĩa vào các túi chất dẻo trước khi nuôi ấm hoặc sử dụng hệ thống có hiệu quả tương đương.

Trong suốt quá trình nuôi ấm, kiểm tra dao động nhiệt độ ủ mà không thể tránh được và có thể chấp nhận được, ví dụ như các thao tác bình thường trong quá trình đưa vào hoặc lấy ra khỏi tủ ấm, quan trọng là các quá trình này cần giữ ngắn nhất. Thời gian của các dao động này cần được kiểm tra để đảm bảo rằng chúng không ảnh hưởng đáng kể đến kết quả.

CHÚ THÍCH Trong các trường hợp nhất định, có thể làm hai đĩa cấy dự phòng bảo quản $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ để so sánh với các đĩa cấy nuôi ấm khi đếm khuẩn lạc, để tránh nhầm lẫn giữa các hạt sản phẩm kiểm tra với các khuẩn lạc. Cũng có thể sử dụng kính lúp binocular để phân biệt các hạt của sản phẩm với các khuẩn lạc.

Trong một số trường hợp cụ thể, để tốt hơn cho việc tổ chức thực hiện trong các phòng thử nghiệm có thể bảo quản lạnh các đĩa đã cấy tối đa 24 h trước khi ủ ấm. Nếu vậy, phòng thử nghiệm phải đảm bảo rằng điều đó không ảnh hưởng đến kết quả đếm.

Nhìn chung, để ủ hiếu khí các đĩa petri không được chồng cao quá sáu đĩa và cần để cách xa nhau và cách xa thành tủ ít nhất là 25 mm. Tuy nhiên, với các tủ ấm có hệ thống tuần hoàn không khí thì có thể chồng cao hơn; trong trường hợp này, cần kiểm tra sự phân bố nhiệt độ.

Sau khi ủ ấm, kiểm tra ngay các đĩa nếu có thể. Tuy nhiên có thể bảo quản đến 48 h trong tủ lạnh, trừ khi có quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể. Bảo quản lạnh trong thời gian dài hơn chỉ có thể chấp nhận được nếu cho thấy không ảnh hưởng đến số lượng, hình dạng bên ngoài hoặc phép khẳng định tiếp theo của các khuẩn lạc. Với môi trường nhất định có chứa chất nhuộm chỉ thị, các đĩa bảo quản lạnh cần được cân bằng đến nhiệt độ phòng trước khi kiểm tra, để đảm bảo rằng màu chính xác đã hoàn lại.

10.3 Tính và biểu thị kết quả thu được với môi trường đặc

10.3.1 Đếm khuẩn lạc

Tiếp theo giai đoạn nuôi ấm được hướng dẫn trong tiêu chuẩn cụ thể, tiến hành đếm khuẩn lạc (số lượng khuẩn lạc tổng số, số lượng khuẩn lạc điển hình hoặc số lượng khuẩn lạc giả định) trên mỗi đĩa có chứa ít hơn 300 khuẩn lạc (hoặc bất kỳ số lượng nào khác được nêu trong tiêu chuẩn cụ thể).

Khi đếm các khuẩn lạc điển hình hoặc giả định, việc mô tả các khuẩn lạc phải giống như trong tiêu chuẩn cụ thể.

Trong các trường hợp cụ thể, có thể rất khó đếm các khuẩn lạc (ví dụ, khi có các vi sinh vật mọc lan). Các khuẩn lạc mọc lan được coi là một khuẩn lạc. Nếu có ít hơn một phần tư đĩa mọc dày đặc bởi các khuẩn lạc mọc lan, thì đếm các khuẩn lạc trên phần không bị ảnh hưởng của đĩa và tính số lượng cho toàn bộ đĩa. Khấu trừ số đếm bằng cách ngoại suy số lượng theo lý thuyết tương ứng với toàn bộ đĩa. Nếu có quá một phần tư đĩa mọc dày đặc thì loại bỏ đĩa đó. Coi các khuẩn lạc mọc lan thành chuỗi là một khuẩn lạc.

Các phương pháp tính toán khác nhau được xác định trong 10.3.2 phải tính đến các đĩa không chứa khuẩn lạc nào, nếu có các đĩa như thế.

Khi sử dụng bộ phân phối dạng xoắn thì việc đếm khuẩn lạc được mô tả trong 10.2.4.3.3.

10.3.2 Biểu thị kết quả

10.3.2.1 Trường hợp chung

10.3.2.1.1 Ở đây có các trường hợp liên quan đến các trường hợp chung như sau:

- cấy một đĩa petri đường kính 90 mm cho mỗi độ pha loãng;
- số lượng tối đa các khuẩn lạc tổng số có mặt: 300 trên mỗi đĩa;
- số lượng tối đa tất cả các khuẩn lạc (điển hình và không điển hình) có mặt trên mỗi đĩa khi đếm khuẩn lạc điển hình hoặc giả định: 300 trên mỗi đĩa;
- số lượng tối đa các khuẩn lạc điển hình và giả định: 150 trên mỗi đĩa;
- số lượng khuẩn lạc giả định (10.3.2.3) đã cấy để nhận biết và khẳng định từ mỗi đĩa còn lại: nhìn chung là 5;

Các con số này phải được xác định trong các tiêu chuẩn cụ thể.

Khi sử dụng các đĩa có đường kính khác với 90 mm, thì số lượng tối đa các khuẩn lạc phải được tăng hoặc giảm tỷ lệ thuận với diện tích bề mặt của đĩa (hoặc màng).

10.3.2.1.2 Các phương pháp tính toán dưới đây đã tính đến những trường hợp thường xuất hiện khi các phép thử nghiệm được tiến hành phù hợp với thực hành phòng thử nghiệm tốt. Rất hiếm gặp các trường hợp đặc biệt (ví dụ: tỷ lệ rất khác nhau của hệ số pha loãng giữa các đĩa của hai độ pha loãng liên tiếp) và do đó các kết quả đếm thu được cần được nhà vi sinh vật học có kinh nghiệm kiểm tra, giải thích hoặc loại bỏ, nếu cần.

TCVN 6404:2008

10.3.2.2 Phương pháp tính: Trường hợp chung (đếm tổng số các khuẩn lạc hoặc các khuẩn lạc điển hình)

Để kết quả có giá trị, cần thực hiện đếm khuẩn lạc trên ít nhất một đĩa có tối thiểu 10 khuẩn lạc [tổng số các khuẩn lạc, khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc phù hợp với tiêu chí nhận dạng (10.3.2.3)].

Tính số lượng N vi sinh vật có mặt trong mẫu thử theo trung bình từ hai độ pha loãng liên tiếp, sử dụng công thức (1):

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d} \quad (1)$$

trong đó

$\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa được giữ lại từ hai độ pha loãng liên tiếp và trong đó ít nhất một đĩa có chứa tối thiểu 10 khuẩn lạc;

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

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

Làm tròn số các kết quả thu được đến hai chữ số có nghĩa. 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 10^x , trong đó x là lũy thừa tương ứng của 10, hoặc làm tròn số với hai chữ số có nghĩa.

Biểu thị kết quả là N vi sinh vật trên mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong 1 gam (sản phẩm dạng khác).

VÍ DỤ Số đếm cho các kết quả như sau:

- ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) được giữ lại: 168 khuẩn lạc;
- ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) được giữ lại: 14 khuẩn lạc.

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d} = \frac{168 + 14}{1 \times 1,1 \times 10^{-2}} = \frac{182}{0,011} = 16545$$

Làm tròn kết quả như hướng dẫn trên thu được 17 000 hoặc $1,7 \times 10^4$ vi sinh vật trong một mililit hoặc một gam sản phẩm.

10.3.2.3 Phương pháp tính toán: Trường hợp tính toán sau khi nhận dạng

Trong trường hợp phương pháp sử dụng đòi hỏi phải nhận dạng, một lượng A được đem xác định (thông thường là 5) từ các khuẩn lạc giả định đã nuôi cấy trên mỗi đĩa được giữ lại để đếm khuẩn lạc. Sau khi nhận dạng, tính số lượng khuẩn lạc phù hợp trên mỗi đĩa theo các tiêu chí, a , theo công thức (2):

$$a = \frac{b}{A} \times C \quad (2)$$

trong đó

b là số khuẩn lạc phù hợp với các tiêu chí xác nhận trong số các khuẩn lạc đã nhận dạng, A ;

C là tổng số khuẩn lạc giả định đếm được trên đĩa.

Làm tròn kết quả tính được đến số nguyên gần nhất. Nếu chữ số thứ nhất sau dấu phẩy nhỏ hơn 5 thì không thay đổi chữ số đứng trước nó; nếu chữ số thứ nhất sau dấu phẩy lớn hơn hoặc bằng 5 thì tăng chữ số đứng trước lên một đơn vị.

Tính số N , các vi sinh vật đã nhận dạng hoặc khẳng định có mặt trong mẫu thử, thay ΣC bằng Σa theo công thức trong 10.3.2.2.

Làm tròn kết quả như trong 10.3.2.2.

Biểu thị kết quả như trong 10.3.2.2.

VÍ DỤ Số đếm cho các kết quả như sau:

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

Việc thử nghiệm các khuẩn lạc chọn lọc đã được tiến hành như sau:

- đối với 66 khuẩn lạc, 8 khuẩn lạc, 6 trong 8 khuẩn lạc đó phù hợp với tiêu chí, do đó $a = 50$.
- đối với 4 khuẩn lạc, tất cả 4 khuẩn lạc phù hợp với tiêu chí, do đó $a = 4$.

$$N = \frac{\Sigma a}{V \times 1,1 \times d} = \frac{50 + 4}{1 \times 1,1 \times 10^{-3}} = \frac{54}{1,1 \times 10^{-3}} = 49090$$

Làm tròn kết quả theo 10.3.2.2, số lượng vi sinh vật là 49 000 hoặc $4,9 \times 10^4$ trong một mililit hoặc trong một gam sản phẩm.

10.3.2.4 Phương pháp tính: các số đếm thấp

10.3.2.4.1 Trường hợp có một đĩa (mẫu thử hoặc huyền phù ban đầu hoặc dung dịch pha loãng thứ nhất) có chứa ít hơn 10 khuẩn lạc

Các số đếm từ 10 trở lên (thực tế) đến giới hạn trên của mỗi phương pháp nằm trong phạm vi độ chụm tối ưu. Tuy nhiên, độ chụm giảm nhanh theo số lượng các khuẩn lạc giảm đến dưới 10. Tùy thuộc vào mục đích của phép thử mà giới hạn dưới của phép xác định có thể xác định như dưới đây cho các số đếm thấp hơn 10.

TCVN 6404:2008

Theo ISO/TR 13843, thì định nghĩa của giới hạn phép xác định là: "Nồng độ thực tế trung bình thấp nhất x trên phần mẫu thử trong đó độ không đảm bảo tiêu chuẩn tương ứng mong đợi bằng giá trị quy định (RSD)". RSD là độ lệch chuẩn tương đối, được tính bằng cách chia số ước tính độ lệch chuẩn s cho nồng độ mẫu bằng \bar{x} cho mẫu đó. Thay cho RSD, ký hiệu w sẽ được sử dụng cho độ lệch chuẩn tương đối. Vì vậy, $w = s/\bar{x}$.

Trong trường hợp phân bố Poission, x được tính bằng công thức sau đây:

$$x = \frac{1}{(w)^2}$$

Nếu w đặt là 50 % theo giới hạn của độ chụm tương đối có thể chấp nhận được (thường hợp lý trong vi sinh học), thì giới hạn dưới của phép xác định sẽ ở số lượng khuẩn lạc của:

$$x = \frac{1}{(0,50)^2} = 4$$

Do đó, kết quả dựa trên số đếm ít hơn bốn cần được xử lý là chỉ phát hiện sự có mặt các vi sinh vật.

Kết luận:

Nếu đĩa chứa ít hơn 10 khuẩn lạc, nhưng có ít nhất 4 khuẩn lạc, thì tính kết quả theo trường hợp chung (10.3.2.2) và báo cáo kết quả là số ước tính x vi sinh vật trong một millilit (sản phẩm ở dạng lỏng) hoặc trong một gam (sản phẩm ở dạng khác).

Nếu tổng số là từ 3 đến 1, thì độ chụm của kết quả là quá thấp và kết quả phải được ghi lại như sau:

"Có mặt các vi sinh vật nhưng nhỏ hơn ($4 \times d$) trên gam hoặc millilit".

10.3.2.4.2 Trường hợp đĩa (mẫu thử hoặc huyền phù ban đầu hoặc dung dịch pha loãng thứ nhất) không chứa khuẩn lạc nào

Nếu đĩa của mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm 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 $1/d$ vi sinh vật trong millilit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc "ít hơn $1/d$ vi sinh vật trong gam (sản phẩm dạng khác)".

trong đó d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu hoặc độ pha loãng thứ nhất đã cấy hoặc giữ lại [$d = 10^0 = 1$ khi sản phẩm dạng lỏng được cấy trực tiếp].

10.3.2.4.3 Trường hợp đặc biệt

10.3.2.4.3.1 Trường hợp chung

Các trường hợp này liên quan đến việc đếm khuẩn lạc điển hình hoặc giả định.

10.3.2.4.3.2 Trường hợp 1

Nếu số lượng của tất cả các khuẩn lạc điển hình hoặc không điển hình đối với đĩa ở độ pha loãng thứ nhất d_1 chứa nhiều hơn 300 (hoặc bất kỳ số lượng khác được nêu trong tiêu chuẩn cụ thể), với số khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc được khẳng định và nếu trên đĩa ở độ pha loãng tiếp theo d_2 chứa ít hơn 300 khuẩn lạc (hoặc bất kỳ số lượng khác được nêu trong tiêu chuẩn cụ thể) không điển hình hoặc khuẩn lạc khẳng định cần đếm, thì biểu thị kết quả như sau:

"ít hơn $1/d_2$ và nhiều hơn $1/d_1$, các khuẩn lạc có trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng)" hoặc "ít hơn $1/d_2$ và nhiều hơn $1/d_1$, trong một gam (sản phẩm dạng khác)"

trong đó d_1 và d_2 là các hệ số pha loãng tương ứng với các độ pha loãng d_1 và d_2 .

VÍ DỤ: Số đếm cho các kết quả như sau:

- ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) được giữ lại: trên mỗi đĩa có mặt nhiều hơn 300 khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc khẳng định;
- ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) được giữ lại: có mặt 33 khuẩn lạc không điển hình hoặc khuẩn lạc khẳng định.

Kết quả được biểu thị là ít hơn 1000 vi sinh vật và nhiều hơn 100 vi sinh vật có trong một mililit hoặc một gam sản phẩm.

10.3.2.4.3.3 Trường hợp 2

Nếu số lượng của các khuẩn lạc điển hình hoặc không điển hình đối với đĩa ở độ pha loãng thứ nhất d_1 chứa nhiều hơn 300 (hoặc bất kỳ số lượng khác được nêu trong tiêu chuẩn cụ thể), không có khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc được khẳng định nào và nếu trên đĩa ở độ pha loãng tiếp theo d_2 chứa ít hơn 300 khuẩn lạc (hoặc bất kỳ số lượng khác được nêu trong tiêu chuẩn cụ thể) không điển hình hoặc khuẩn lạc khẳng định cần đếm, thì biểu thị kết quả như sau:

"ít hơn $1/d_2$ các khuẩn lạc có trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng)" hoặc "ít hơn $1/d_2$ các khuẩn lạc có trong một gam (sản phẩm dạng khác)".

trong đó d_2 là các hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng d_2 .

VÍ DỤ: Số đếm cho các kết quả như sau:

TCVN 6404:2008

- ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) được giữ lại: trên mỗi đĩa có mặt nhiều hơn 300 khuẩn lạc không điển hình hoặc không định;
- ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) được giữ lại: có mặt 33 khuẩn lạc không điển hình hoặc không định.

Kết quả được biểu thị là ít hơn 1000 vi sinh vật có trong một millilit hoặc một gam sản phẩm.

10.3.2.5 Phương pháp tính: Trường hợp đặc biệt

10.3.2.5.1 Khi số lượng các khuẩn lạc đếm được (khuẩn lạc tổng số, khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc giả định) lớn hơn 300 (hoặc bất kỳ số lượng khác được nêu trong tiêu chuẩn cụ thể) trên đĩa ở độ pha loãng d_1 , với số khuẩn lạc (khuẩn lạc tổng số, khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc phù hợp với các chuẩn xác nhận) trên đĩa ở độ pha loãng tiếp theo d_2 chứa ít hơn 10 khuẩn lạc:

- nếu số lượng khuẩn lạc trên đĩa ở độ pha loãng d_1 nằm trong khoảng từ 300 đến 334 (giới hạn trên của khoảng tin cậy đối với giá trị trung bình bằng 300), sử dụng phương pháp tính đối với trường hợp chung (10.3.2.2);
- nếu số lượng khuẩn lạc trên đĩa ở độ pha loãng d_1 nhiều hơn 334 (giới hạn trên của khoảng tin cậy đối với giá trị trung bình bằng 300), thì chỉ tính đến kết quả của số đếm của độ pha loãng d_2 và thực hiện tiếp với số đếm ước tính (10.3.2.4), ngoại trừ khi đối chiếu với số tối đa đặt ở 300 để đếm các khuẩn lạc, nếu kết quả ở độ pha loãng d_2 ít hơn 8 (giới hạn dưới của khoảng tin cậy đối với giá trị trung bình bằng 10) do chênh lệch giữa hai độ pha loãng là không thể chấp nhận được.

Các con số tương ứng với khoảng tin cậy cần phải phù hợp với số tối đa được nêu đối với việc đếm khuẩn lạc.

VÍ DỤ 1: Số đếm cho các kết quả như sau:

- ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) được giữ lại: 310 khuẩn lạc;
- ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) được giữ lại: 8 khuẩn lạc.

Áp dụng phương pháp tính đối với các trường hợp chung, sử dụng các đĩa ở hai độ pha loãng được giữ lại.

VÍ DỤ 2: Số đếm cho các kết quả như sau:

- ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) được giữ lại: nhiều hơn 334 khuẩn lạc trên đĩa;
- ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) được giữ lại: 9 khuẩn lạc.

Bắt đầu số đếm ước tính được trên cơ sở các khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa từ độ pha loãng 10^{-3} .

VÍ DỤ 3: Số đếm (khi số tối đa để đếm khuẩn lạc đã được cài đặt là 300) cho các kết quả như sau:

- ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) được giữ lại: nhiều hơn 334 khuẩn lạc trên đĩa;
- ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) được giữ lại: 7 khuẩn lạc.

Kết quả đếm này là không thể chấp nhận được.

VÍ DỤ 4: Số đếm (khi số tối đa để đếm khuẩn lạc đã được cài đặt là 150) cho các kết quả như sau:

- ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) được giữ lại: nhiều hơn 167 khuẩn lạc trên mỗi đĩa (giới hạn trên của khoảng tin cậy đối với giá trị trung bình bằng 150);
- ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) được giữ lại: 7 khuẩn lạc.

Bất đầu số đếm ước tính được trên cơ sở các khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa từ độ pha loãng 10^{-3} .

10.3.2.5.2 Khi số đếm các khuẩn lạc (các khuẩn lạc tổng số, khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc giả định) đối với mỗi đĩa đối với tất cả các độ pha loãng đã được cấy tạo ra một lượng lớn hơn 300 (hoặc bất kỳ số lượng khác được nêu trong tiêu chuẩn cụ thể), thì biểu thị kết quả như sau:

- "nhiều hơn $300/d$ " (trường hợp các khuẩn lạc tổng số hoặc khuẩn lạc điển hình) hoặc "nhiều hơn $300 \times b/A \times 1/d$ " (trường hợp khuẩn lạc đã khẳng định) vi sinh vật có trong một millilit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc một gam (sản phẩm dạng khác).

trong đó

d là hệ số pha loãng của dung dịch cấy sau cùng;

b là số lượng khuẩn lạc phù hợp với chuẩn xác nhận hoặc khẳng định trong số các khuẩn lạc giả định đã được cấy, A .

10.3.2.5.3 Khi đĩa chứa độ pha loãng được cấy sau cùng nhiều hơn 10 khuẩn lạc và ít hơn 300 (hoặc bất kỳ số lượng khác được nêu trong tiêu chuẩn cụ thể) khuẩn lạc (khuẩn lạc tổng số, khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc giả định) thì tính số N' các vi sinh vật có mặt trong mẫu thử là trung bình số khuẩn lạc có trên hai đĩa, sử dụng công thức (4):

$$N' = \frac{c}{V \times d} \quad (4)$$

trong đó

c là tổng số khuẩn lạc đếm được trên đĩa;

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

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng được giữ lại.

TCVN 6404:2008

Làm tròn kết quả theo 10.3.2.2.

Biểu thị kết quả là số lượng vi sinh vật N' có trong millilit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong gam (sản phẩm dạng khác).

VÍ DỤ: Số đếm cho các kết quả như sau:

- ở độ pha loãng cuối cùng (10^{-4}) được cấy: 120 khuẩn lạc;

$$N' = \frac{120}{1 \times 10^{-4}} = 1200000$$

Làm tròn kết quả theo 10.3.2.2, số lượng vi sinh vật N' là 1 200 000 hoặc $1,2 \times 10^6$ trong một millilit hoặc trong một gam sản phẩm.

10.3.2.6 Đo độ không đảm bảo đo

Xem ISO/TR 19036 đối với các phép định lượng.

10.4 Định lượng nấm men và nấm mốc

10.4.1 Yêu cầu chung

Nấm men và nấm mốc thường dễ dàng định lượng bằng kỹ thuật đổ đĩa hoặc bằng kỹ thuật cấy bề mặt cho phép các tế bào tiếp xúc tối đa với ôxi trong không khí và tránh bị hỏng do nhiệt từ thạch tan chảy. Các đĩa thạch cần được làm khô trước khi cấy (xem ISO/TS 11133).

Một số nấm men và nấm mốc có thể lây nhiễm hoặc gây dị ứng, đôi khi ngay cả đối với người khỏe mạnh. Do đó, cần phải phòng ngừa khi làm việc với nấm men và nấm mốc. Tốt nhất là nên giữ chúng trong tủ ấm mà không để trong phòng mở. Nắp đĩa chỉ được mở khi cần, thông thường như để chuẩn bị vật kính hiển vi. Kim cấy được đốt trên ngọn lửa phải được làm nguội trước khi chuyển mẫu, để tránh phân tán các hạt dính và các tế bào khác. Các bàn làm việc và tủ ấm cần thường xuyên được khử trùng.

Các đĩa petri cần được ủ ấm theo tư thế hướng lên trên và để yên cho đến khi các đĩa đã sẵn sàng để đếm, vì khi xê dịch sẽ làm giải phóng các hạt hoặc bào tử nấm mốc và phát triển tiếp thành các khuẩn lạc, cho ước tính quá lượng nấm mốc.

10.4.2 Định lượng nấm men và nấm mốc

Thường đếm các đĩa chứa từ 10 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc. Nếu hệ nấm bao gồm chủ yếu các nấm mốc, thì chọn các đĩa có các số đếm trong phạm vi quần thể thấp hơn; nếu hệ nấm bao gồm chủ yếu các nấm men, thì các đĩa có các số đếm đến giới hạn trên có thể được chọn để đếm.

Nếu còn nghi ngờ thì kiểm tra bằng cách soi tươi hoặc nhuộm tế bào từ ít nhất 5 khuẩn lạc trên mẫu để khẳng định rằng không có mặt vi khuẩn.

10.5 Định lượng sử dụng môi trường lỏng

10.5.1 Nguyên tắc

Các phần mẫu thử được cấy vào môi trường lỏng để hỗ trợ cho sự phát triển các vi sinh vật đặc trưng hoặc nhóm vi sinh vật và thường ức chế sự tăng nhanh các vi sinh vật không phải mục tiêu.

Để xác định xem có sự phát triển các vi sinh vật mục tiêu hay không, thì có thể sử dụng nhiều tiêu chí khác nhau, ví dụ như phát hiện bằng mắt về độ đục, sự sinh khí, sự đổi màu, phân lập tiếp các vi sinh vật trên môi trường thạch chọn lọc. Thành phần của môi trường và tiêu chí phân biệt giữa kết quả âm tính và dương tính được xác định trong các tiêu chuẩn tương ứng.

Với cách tiếp cận này, chỉ giá trị định lượng có thể quy cho từng phần mẫu thử, nghĩa là kết quả là dương tính hoặc là âm tính. Để thu được số ước lượng vi sinh vật có mặt, thì cần kiểm tra vài phần mẫu thử và sử dụng quy trình thống kê để xác định số có xác suất lớn nhất (MPN).

10.5.2 Cấy

10.5.2.1 Yêu cầu chung

Nếu sử dụng môi trường phát triển chọn lọc, thì việc thêm phần mẫu thử không được tạo ra đặc tính chọn lọc của nó (do đó, cho phép các vi sinh vật không mục tiêu phát triển). Trong nhiều tiêu chuẩn, thông tin về khả năng so sánh của các chất nền đặc hiệu và môi trường lỏng được mô tả trong phần phạm vi áp dụng, nhưng cần chú ý với các chất nền như gia vị, cacao, canh thang thịt v.v..., vì chúng có thể chứa các chất ức chế phát triển mà cần phải bổ sung các hợp chất trung hoà, sử dụng các hệ số pha loãng cao hơn, ly tâm, lọc hoặc tách từ miễn dịch để tách các vi sinh vật mục tiêu ra khỏi chất nền, ngay cả điều này cũng không phải lúc nào cũng xác định rõ trong các tiêu chuẩn cụ thể. Tính xung đột có thể do thành phần vi khuẩn trong chất nền: các mẫu môi trường bị nhiễm nặng, các sản phẩm lên men hoặc các sản phẩm có vi khuẩn probiotic sẽ khó khăn hơn cho người phân tích vi sinh so với các mẫu chỉ chứa rất ít vi sinh vật. Đối với các chất nền gặp phải vấn đề đó, cần tiến hành các thực nghiệm sử dụng các vi sinh vật đại diện để chứng minh rằng phương pháp này có thể so sánh được bằng chất nền.

10.5.2.2 Cách tiến hành

Thường lấy các thể tích phần mẫu thử ít hơn hoặc bằng 1 ml cho vào từ năm đến mười lần thể tích môi trường nồng độ đơn, trừ khi có quy định khác trong các tiêu chuẩn cụ thể. Thường cho thêm các thể tích mẫu thử từ 1 ml đến 100 ml vào các thể tích tương tự của môi trường nồng độ kép.

TCVN 6404:2008

Đối với các thể tích lớn hơn 100 ml, thì có thể sử dụng môi trường đậm đặc hơn. Đối với các mục đích đặc biệt, môi trường khô vô trùng có thể được hoà tan trong mẫu lạnh (hoặc được làm ấm sơ bộ đến 30 °C) cần phân tích.

Thời gian tính từ khi chuẩn bị dung dịch pha loãng thứ nhất của mẫu thử đến khi cấy vào ống cuối cùng, đĩa nhiều giếng hoặc chai lọ cần phải ít hơn 15 min, trừ khi có quy định khác.

Sử dụng một pipet mới vô trùng cho mỗi độ pha loãng.

10.5.3 Chọn hệ thống cấy

Điều cơ bản của kỹ thuật MPN là việc pha loãng mẫu đến mức độ mà chủng cấy đôi khi có mặt nhưng không phải lúc nào cũng chứa các vi sinh vật còn sống. "kết quả" nghĩa là chủng cấy có phát triển ở mỗi độ pha loãng sẽ cho số ước tính về nồng độ ban đầu trong mẫu. Để thu được các số ước tính bao trùm phạm vi mật độ có thể, người phân tích cần sử dụng một dãy các độ pha loãng, ở một dãy các ống (hoặc các đĩa v.v...) cho mỗi độ pha loãng. Số có xác suất lớn nhất của các vi sinh vật có mặt trong mẫu gốc và độ chụm ước tính có thể được tính bằng thống kê dựa trên số lượng ống dương tính và âm tính quan sát được sau khi ủ.

Chọn từ các số có xác suất lớn nhất (MPN) có sẵn theo:

- số lượng vi sinh vật dự kiến trong mẫu cần xem xét,
- các yêu cầu quy định,
- độ chụm thực yêu cầu, và
- mọi xem xét thực tế khác.

Độ không đảm bảo đo phụ thuộc vào số lượng phần mẫu thử dương tính quan sát được theo cùng một cách như độ không đảm bảo đo của số đếm khuẩn lạc phụ thuộc vào số lượng khuẩn lạc trên đĩa. Độ không đảm bảo đo tăng dần theo căn bậc hai của số ống được sử dụng. Số lượng ống nhân bốn lần giảm một nửa độ không đảm bảo đo. Khi các hệ thống chỉ có một lượng nhỏ các ống kép được sử dụng, thì độ không đảm bảo đo là rất thấp.

Tùy thuộc vào kích cỡ, các phần mẫu thử có thể được cấy vào các ống hoặc các chai chứa một lượng cần thiết môi trường lỏng. Đối với các phần mẫu thử nhỏ, có thể sử dụng các đĩa nhiều giếng.

10.5.3.1 Hệ thống dùng một dung dịch pha loãng

Khi nồng độ vi sinh vật dự kiến là nhỏ hoặc được dự kiến dao động vừa phải thì hầu hết hệ thống nuôi cấy thích hợp là các dãy đơn lẻ của các phần mẫu thử bằng nhau. Khi tỷ lệ dự kiến của số đếm vi sinh

vật tối đa và tối thiểu nhỏ hơn 25 thì mười phần mẫu thử song song là số lượng nhỏ nhất dự kiến thực hiện; với 50 ống song song thì giới hạn tỷ lệ là 200. Các ví dụ số đếm MPN được nêu trong các Bảng từ B.1 đến B.4 của Phụ lục B.

10.5.3.2 Hệ thống dùng nhiều dung dịch pha loãng

Khi nồng độ vi sinh vật dự kiến chưa được biết hoặc nếu lường trước có sự dao động lớn, thì có thể cần phải nuôi cấy một loạt các ống từ một số dung dịch pha loãng. Cấy một lượng vừa đủ các dung dịch pha loãng để đảm bảo hệ thống có các kết quả dương tính và âm tính. Số lượng các dung dịch pha loãng phụ thuộc vào phương pháp tính được sử dụng để ước tính giá trị MPN. Nếu cần sử dụng các bảng thì các kết quả từ ba độ pha loãng cần có sẵn và các dạng của hệ thống được giới hạn theo các bảng. Với các chương trình máy tính, thì số lượng dung dịch pha loãng và các ống song song là không bị giới hạn.

10.5.3.3 Hệ thống dùng dung dịch pha loãng đối xứng

Phần lớn hệ thống MPN đối xứng được áp dụng thông thường sử dụng ba hoặc năm ống song song cho mỗi dung dịch pha loãng. Độ chụm thu được với hệ thống này giảm nhanh với các số ống thấp hơn trên một dung dịch pha loãng. Các kết quả thu được từ kiểu ba ống là khó hơn so với kiểu nhiều ống. Nếu yêu cầu độ chụm lớn hơn, thì nên chọn kiểu năm ống hoặc nhiều ống song song. Các ví dụ về MPN ba ống và năm ống được nêu tương ứng trong các Bảng B.5 và B.7 tương ứng.

10.5.3.4 Hệ thống dùng dung dịch pha loãng không đối xứng

Trong hệ thống dùng dung dịch pha loãng không đối xứng, các mức pha loãng khác nhau không có số lượng các ống giống nhau. Sử dụng các hệ thống này chỉ để ước tính số lượng vi sinh vật nằm trong phạm vi xác định. Các ví dụ, xem ISO 8199.

10.5.4 Ủ ấm

Ủ ấm các ống, bình hoặc chai đã nuôi cấy, trong tủ ấm hoặc trên nổi cách thủy. Đặt các đĩa nhiều giếng trong tủ ấm.

Chọn thời gian và nhiệt độ ủ sau khi tham khảo phương pháp chuẩn riêng, vì chúng phụ thuộc vào vi sinh vật hoặc nhóm vi sinh vật.

Đối với một số vi sinh vật, có thể cần hai giai đoạn ủ ấm và/hoặc bước khẳng định. Chi tiết xem các tiêu chuẩn cụ thể.

10.5.5 Diễn giải kết quả

Tiêu chí để phân biệt các kết quả dương tính và âm tính thay đổi với mỗi loại vi sinh vật hoặc nhóm vi sinh vật và được xác định trong các tiêu chuẩn tương ứng. Sử dụng các tiêu chí này để đếm và ghi lại số lượng kết quả dương tính và âm tính thu được với tất cả các phần mẫu thử từ một mẫu.

TCVN 6404:2008

10.5.6 Xác định các giá trị MPN

Có ba khả năng khác nhau để xác định các giá trị MPN: tính bằng công thức toán học, tra Bảng MPN, hoặc ứng dụng các chương trình máy tính cụ thể. Với điều kiện là chúng đều được dựa trên cùng một cơ sở thống kê, có giá trị như nhau. Ba phương pháp này được cụ thể như sau:

10.5.6.1 Công thức toán học

10.5.6.1.1 Công thức gần đúng cho tất cả các trường hợp

Các giá trị gần đúng của MPN đối với số lượng bất kỳ của các dung dịch pha loãng và các ống so sánh thu được từ việc áp dụng công thức sau đây (chấp nhận từ [36]):

$$MPN = \left[\frac{Z_p \times m_r}{\sqrt{m_s \times m_i}} \right]$$

trong đó

Z_p là số ống dương tính;

m_r khối lượng chuẩn của mẫu, tính bằng gam;

m_s khối lượng tổng số của mẫu có trong tất cả các ống có phản ứng âm tính, tính bằng gam;

m_i khối lượng tổng số của mẫu có trong tất cả các ống, tính bằng gam.

MPN được biểu thị trên gam mẫu (thường là 1 g, đôi khi là 100 g).

10.5.6.1.2 Dung dịch "chính xác" đối với một dãy các ống

Giá trị MPN đối với một dãy ống thu được từ công thức sau đây:

$$MPN = \frac{m_r}{m_m} \ln \left[\frac{n}{n - Z_p} \right]$$

trong đó

m_r khối lượng chuẩn của mẫu, tính bằng gam;

m_m khối lượng tổng số của mẫu trong mỗi ống của dãy, tính bằng gam;

\ln logarit tự nhiên;

n số lượng ống trong một dãy;

Z_p là số lượng ống có phản ứng dương tính.

10.5.6.1.3 Độ chụm ước tính các phép phân tích với một dung dịch pha loãng

Các giới hạn tin cậy 95 % của MPN ước tính có thể tính được dùng công thức sau đây:

$$x = \frac{m_r}{m_m} \ln \left[\frac{n}{z_n \pm 2 \sqrt{\frac{z(n-z_n)}{n}}} \right]$$

trong đó

x là giới hạn tin cậy trên và dưới 95 %;

m_r khối lượng chuẩn của mẫu, tính bằng gam;

m_m khối lượng của mẫu trong mỗi ống của dãy, tính bằng gam;

\ln logarit tự nhiên;

n số lượng ống trong một dãy;

z_n là số lượng ống có phản ứng âm tính.

Dấu cộng có liên quan với giới hạn dưới và dấu trừ liên quan với giới hạn trên. Gần đúng là không được tốt khi phần lớn các ống âm tính (vô trùng) nhưng được cải thiện khi tỷ lệ các ống dương tính tăng lên.

10.5.6.1.4 Độ chụm ước tính các phép phân tích với nhiều dung dịch pha loãng đối xứng

Độ không đảm bảo chuẩn \log_{10} của hệ thống MPN nhiều dung dịch pha loãng đối xứng có thể thu được dùng công thức Cochran's sau đây ^[28]:

$$SE = 0,58 \sqrt{\frac{\log_{10} f}{n}}$$

trong đó

SE là sai số chuẩn của \log_{10} MPN;

f là hệ số pha loãng giữa các dung dịch pha loãng kế tiếp (lớn nhất là 10);

n là số lượng ống cho mỗi dung dịch pha loãng;

Các giới hạn tin cậy trên và dưới khoảng tin cậy 95 % có thể tính gần đúng bằng cách nhân và chia số ước tính MPN cho đối loga của $2 \times SE$. Quy trình này dùng để tăng nhiều giới hạn tin cậy trên.

TCVN 6404:2008

10.5.6.2 Các bảng MPN

10.5.6.2.1 Các bảng dùng cho hệ thống một dung dịch pha loãng

Các Bảng từ B.1 đến B.4 (Phụ lục B) cho các giá trị MPN và khoảng tin cậy 95 % trên phần mẫu thử đối với 10 ống, 15 ống, 20 ống và 25 ống song song (mỗi ống được cấy cùng một dung dịch pha loãng).

Để biểu thị kết quả trên khối lượng chuẩn của mẫu (hoặc thể tích của các mẫu dạng lỏng), thì nhân MPN và các giá trị giới hạn 95 % cho tỷ lệ (khối lượng chuẩn)/(khối lượng phần mẫu thử). Không nhân với độ không đảm bảo chuẩn loga. Khối lượng mẫu chuẩn trong vi sinh vật thực phẩm thường là 1 g. Khối lượng phần mẫu thử tương ứng với lượng mẫu (bằng gam) có mặt trong thể tích được dùng để cấy vào ống, ví dụ 0,1 g nếu sử dụng 1 ml của huyền phù đồng nhất 10^{-1} .

VÍ DỤ ((30))

Hai mươi ống canh thang nồng độ kép đã được cấy 5 ml mẫu đã pha loãng mười lần (0,1 g/ml). Sau khi ủ, 16 ống cho thấy vi sinh vật có phát triển. Mật độ (vi sinh vật trên gam) vi khuẩn nào là có xác suất lớn nhất trong mẫu? Bảng B.3 cho 1,61 số có xác suất lớn nhất các vi sinh vật trên ống, có 0,93 giới hạn dưới 95 % và 2,77 giới hạn trên 95 %.

Mỗi ống nhận 5 ml phần mẫu thử tương ứng với 0,5 g mẫu. Do đó, số vi sinh vật có xác suất lớn nhất trong 1 g là:

$$\text{MPN} = \frac{1,61}{0,5} \text{ trên gam} = 3,2 \text{ trên gam}$$

với khoảng tin cậy 95 % dao động từ

$$\text{giới hạn dưới 95 \%} = \frac{0,93}{0,5} \text{ trên gam} = 1,9 \text{ trên gam};$$

$$\text{giới hạn trên 95 \%} = \frac{2,77}{0,5} \text{ trên gam} = 5,5 \text{ trên gam};$$

10.5.6.2.2 Các bảng dùng cho hệ thống nhiều dung dịch pha loãng: ba dung dịch pha loãng liên tiếp

Với các hệ thống không đối xứng, thường sử dụng ba dung dịch pha loãng liên tiếp với ba ống (Bảng B.5) hoặc năm ống kép (Bảng B.7). Ghi lại số lượng các kết quả dương tính cho một dãy các ống và từ bảng MPN đối với hệ thống cấy đã sử dụng, đọc số có xác suất lớn nhất các vi sinh vật có mặt trong thể tích chuẩn của mẫu.

Một số tổ hợp các ống dương tính có nhiều khả năng xuất hiện hơn so với tổ hợp khác. Ví dụ: tổ hợp các kết quả dương tính 0, 0, 3 ít có khả năng xuất hiện hơn so với tổ hợp 3, 2, 1. Để đếm khả năng này thì

tất cả các kết quả dương tính đã được quy cho cấp 0 đến cấp 3. Kết quả cấp 1 là kết quả có xác suất cao hơn, trong khi đó kết quả cấp 3 là thấp hơn và có thể không dễ tái tạo. Các trường hợp xấu nhất là các kết quả thuộc cấp 0; chúng cần được coi là nghi ngờ nhất. Giả sử rằng các kết quả phân tích là đúng thì duy nhất có thể hy vọng rằng 95 % các tổ hợp quan sát được có thể rơi vào cấp 1, 4 % cấp 2, 0,9 % cấp 3 và chỉ 0,1 % cấp 0. Các cấp được diễn giải tiếp theo trong Bảng B.6.

Trong trường hợp có nhiều hơn ba dung dịch pha loãng, thì chọn tổ hợp "phải" của ba dung dịch pha loãng liên tiếp không phải lúc nào cũng rõ ràng. Tuy nhiên, điều này có thể dễ dàng thực hiện bằng cách ghi lại tất cả các tổ hợp có khả năng cho các ống dương tính và đọc cấp tương ứng từ Bảng B.5.

Do đó, áp dụng các nguyên tắc sau đây:

- 1) Chọn tổ hợp của ba dung dịch pha loãng liên tiếp có dạng cấp 1 để thu được chỉ số MPN. Nếu có nhiều hơn một tổ hợp có dạng cấp 1 thì sử dụng một tổ hợp có số ống dương tính cao nhất.
- 2) Nếu không có tổ hợp nào có dạng của cấp 1, thì sử dụng một tổ hợp có dạng của cấp 2. Nếu có nhiều hơn một tổ hợp có dạng cấp 2 thì sử dụng một tổ hợp có số ống dương tính cao nhất.
- 3) Nếu không có tổ hợp nào có dạng của cấp 2, thì sử dụng một tổ hợp có dạng của cấp 3. Nếu có nhiều hơn một tổ hợp có dạng cấp 3 thì sử dụng một tổ hợp có số ống dương tính cao nhất.

Một số ví dụ được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 – Các ví dụ về lựa chọn các kết quả dương tính để tính MPN

Mẫu	Số lượng các ống dương tính thu được từ ba ống đã ủ đối với các lượng mẫu thử đã cấy trong một ống ^a sau đây					MPN ^b	
						Sản phẩm dạng lỏng (ml ⁻¹)	Sản phẩm dạng khác (g ⁻¹)
	Sản phẩm dạng lỏng: 10 ml Sản phẩm dạng khác: 1 g	1 ml 10 ⁻¹ g	10 ⁻¹ ml 10 ⁻² g	10 ⁻² ml 10 ⁻³ g	10 ⁻³ ml 10 ⁻⁴ g		
1	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	1	0	1,1 x 10 ¹	1,1 x 10 ²
2	3	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>		2,4 x 10 ¹	2,4 x 10 ²
3	2	2	1	1	<u>0</u>	7,4	7,4 x 10 ¹
4	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	0	0	2,4	2,4 x 10 ¹
5	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	1	0	2,1 x 10 ⁻¹	2,1

^a Các con số gạch chân cho thấy các tổ hợp được chọn.
^b Tính được sử dụng chỉ số MPN (xem Bảng B.5).

TCVN 6404:2008

10.5.6.3 Chương trình máy tính

Các chương trình máy tính đa năng cho các số có liên quan không giới hạn và các ống song song hoặc sự đối xứng của hệ thống MPN. Máy phân tích MPN là chương trình cài sẵn theo chương trình trước đây (xem [29]).

10.5.7 Biểu thị kết quả

Từ chỉ số MPN đọc được từ Bảng B.5 [theo tổ hợp ba (hoặc năm) dung dịch pha loãng liên tiếp giữ lại], xác định các vi sinh vật có xác suất lớn nhất trong một thể tích chuẩn.

Báo cáo kết quả là số vi sinh vật có xác suất lớn nhất (hoặc nhóm các vi sinh vật đặc thù) trên gam hoặc trên mililit. Khối lượng hoặc thể tích chuẩn có thể khác với gam hoặc mililit (ví dụ 100 g hoặc 100 ml).

11 Phương pháp phát hiện (phương pháp định tính)

11.1 Yêu cầu chung

Phương pháp phát hiện là phương pháp xác định sự có mặt hay không các vi sinh vật nhất định có trong một lượng qui định của sản phẩm.

11.2 Nguyên tắc

Trộn (sản phẩm thể lỏng), hoặc đồng nhất (sản phẩm dạng khác) một lượng P của sản phẩm cần thử $9 \times P$ ml hoặc $9 \times P$ g của 1 loại canh thang chọn lọc, nếu không có qui định khác trong các tiêu chuẩn riêng.

Để tăng độ thu hồi các vi sinh vật trong thực phẩm, tốt nhất nên tiến hành tăng sinh trước trong canh thang không chọn lọc, sau đó tăng sinh trong canh thang chọn lọc và phân lập trên thạch khác nhau/thạch chọn lọc. Việc sử dụng hai canh thang tăng sinh khác nhau cũng như hai hoặc nhiều môi trường thạch chọn lọc sẽ làm tăng độ nhạy của phương pháp.

Sau khi nuôi ấm, dàn mỏng một vòng dịch cấy thu được lên bề mặt môi trường thạch chọn lọc sao cho các khuẩn lạc mọc phân tách tốt. Khi không có quy định khác thì các canh thang tăng sinh đã ủ ấm chỉ có thể được làm lạnh sau khi đã đánh giá ảnh hưởng của việc làm lạnh lên các kết quả và chỉ nếu được quy định rõ trong báo cáo kết quả.

Số lượng (thường là năm trên một đĩa thạch) các khuẩn lạc thu được sau khi ủ được nhận dạng sử dụng các kỹ thuật khẳng định thích hợp.

Việc chọn các khuẩn lạc để khẳng định cần bao trùm các loại khuẩn lạc đại diện nghi ngờ.

11.3 Đo độ không đảm bảo

Ước tính độ không đảm bảo đo của các phép định lượng đang được ISO/TC34/SC 9 nghiên cứu.

12 Phương pháp khẳng định

12.1 Yêu cầu chung

Chỉ sử dụng các khuẩn lạc thuần khiết để khẳng định bằng sinh hoá và huyết thanh học.

Các phép thử khẳng định được mô tả trong các tiêu chuẩn cụ thể. Để thay cho các phép thử sinh hoá quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể, có thể sử dụng các phương pháp thử khẳng định (dị ứng sinh hoá, dấu dò nucleic) dưới các điều kiện quy định trong điều kiện này, trừ khi có quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể.

12.2 Chuẩn bị chủng cấy thuần khiết

Bắt đầu chuẩn bị một chủng cấy thuần khiết bằng cách chọn lọc một khuẩn lạc trên hoặc trong môi trường thạch. Cấy khuẩn lạc đã chọn lên môi trường thạch không chọn lọc. Sau khi nuôi ấm, chọn lấy một khuẩn lạc phân lập tốt cho việc thử khẳng định tiếp theo. Lặp lại thao tác này, nếu cần.

Nếu có thể, các phép thử khẳng định cần được tiến hành trên các tế bào từ một khuẩn lạc. Nếu không có đủ lượng tế bào trong một khuẩn lạc, thì trước hết cần được cấy truyền vào môi trường lỏng hoặc lên môi trường thạch nghiêng, sau đó các dịch cấy truyền có thể được dùng để thử khẳng định.

12.3 Nhuộm Gram (kỹ thuật Hucker cải biến)

12.3.1 Yêu cầu chung

Việc nhuộm màu các tế bào vi khuẩn này cho phép mô tả được hình thái của vi khuẩn và phân loại chúng thành hai nhóm theo chức năng, chúng có thể hay không thể giữ được màu tím của thuốc nhuộm tím tinh thể (Gram +) trong các điều kiện thử nghiệm. Các kết quả phân loại này phần lớn dựa trên sự khác nhau về cấu trúc thành tế bào của hai nhóm và là điểm khác biệt chính giữa hai nhóm.

Cách thay thế cho nhuộm màu Gram là sử dụng dung dịch kali hydroxit (KOH) 3%. Lấy một vòng cấy các khuẩn lạc phát triển và khuấy trong 2 giọt dung dịch KOH. Vi khuẩn Gram âm có thể làm cho dung dịch trở nên sánh và nhờn trong 30 s, tạo thành dây khi nhấc vòng cấy ra.

Có một số cách hướng dẫn nhuộm màu Gram, nhưng tất cả phải theo các bước tuần tự dưới đây:

TCVN 6404:2008

12.3.2 Dung dịch

12.3.2.1 Yêu cầu chung

Có thể dùng các dung dịch bán sẵn.

Trong trường hợp này, phải tuân theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất.

12.3.2.2 Dung dịch tím tinh thể

12.3.2.2.1 Thành phần

Tím tinh thể:	2,0 g
Etanol (95 %):	20 ml
Amoni oxalat ($C_2H_8N_2O_4$):	0,8 g
Nước cất:	80 ml

12.3.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan tím tinh thể trong etanol và amoni oxalat trong nước cất. Trộn hai dung dịch này và để yên hỗn hợp 24 h trước khi sử dụng.

12.3.2.3 Dung dịch iốt

12.3.2.3.1 Thành phần

Iốt:	1,0 g
Kali iodua (KI):	2,0 g
Nước:	100 ml

12.3.2.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan kali iodua trong 10 ml nước cất; thêm từng phần nhỏ iốt. Sau khi hoà tan, thêm nước cho đến vạch mức 100 ml trong bình định mức.

12.3.2.4 Dung dịch safranin

12.3.2.4.1 Thành phần

Safranin:	0,25 g
Etanol (95 %):	10 ml

Nước: 100 ml

12.3.2.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan safranin trong dung dịch etanol sau đó trộn với nước cất.

12.3.3 Kỹ thuật nhuộm

Sau khi đã cố định trên lam kính màng vi khuẩn được chuẩn bị từ dịch cấy từ 18 h đến 24 h, hoặc khi canh thang đã đục, thì phủ lên màng này dung dịch tím tinh thể. Để cho phản ứng xảy ra trong 1 min.

Tráng nhẹ lam kính để ở tư thế nghiêng bằng nước trong vài giây.

Phủ lên lam kính dung dịch iốt. Để cho phản ứng xảy ra trong 1 min.

Tráng nhẹ lam kính để ở tư thế nghiêng bằng nước trong vài giây.

Rót một cách nhẹ nhàng và liên tục một lớp mỏng dung dịch etanol (95 %) lên lam kính để nghiêng trong khoảng thời gian không quá 30 s cho đến khi không còn màu tím.

Tráng nhẹ lam kính để ở tư thế nghiêng bằng nước để loại etanol. Phủ lên lam kính bằng dung dịch safranin trong 10 s. Tráng nhẹ lam kính để ở tư thế nghiêng bằng nước.

Làm khô lam kính.

12.3.4 Diễn giải kết quả

Kiểm tra lam kính dưới vật kính dầu có độ phóng đại cao của kính hiển vi. Các tế bào vi khuẩn có màu xanh lam hoặc màu tím là Gram dương (Gram +); có màu từ hồng thắm đến đỏ là Gram âm (Gram -).

Đối với chủng thuần khiết của một vài dạng vi khuẩn nhất định, có thể thu được cả tế bào Gram dương và Gram âm trong cùng một trường hiển vi.

CHÚ THÍCH Các tế bào vón đặc có thể cho hình ảnh không đặc trưng.

12.4 Sử dụng bộ thử sinh hoá để nhận biết

Có thể dùng bộ thử sinh hoá có sẵn để nhận biết các khuẩn lạc tách biệt.

Cần kiểm tra xác nhận rằng các bộ thử là thích hợp, như đã được nghiên cứu đánh giá trong các tài liệu khoa học liên quan đến vi sinh vật trong thực phẩm⁴⁾. Việc kiểm tra này hết sức quan trọng nếu nhà sản xuất không có các số liệu đánh giá về các bộ thử này.

⁴⁾ Yêu cầu về thông tin được bổ sung từ các tài liệu viện dẫn của quốc gia, vùng hoặc quốc tế đối với việc nhận biết từng vi sinh vật.

TCVN 6404:2008

Các phòng thử nghiệm cần phải thu được các chứng chỉ kiểm chứng cho mỗi mẻ với việc chỉ rõ các chủng thử nghiệm.

Nhà sản xuất cũng phải quy định các chứng kiểm chứng rằng các phòng thử nghiệm có thể sử dụng để kiểm tra việc bảo quản hiệu quả của các bộ thử.

Các bộ thử phải bao gồm tối thiểu các phép thử sinh hoá được quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể hoặc cần được bổ sung bằng các phép thử khác.

12.5 Sử dụng các đầu dò nucleic

Có thể dùng các đầu dò nucleic có sẵn để nhận biết các khuẩn lạc tách biệt.

Tuy nhiên, kiểm tra xác nhận rằng các đầu dò nucleic là thích hợp, như đã được nghiên cứu đánh giá trong các tài liệu khoa học liên quan đến vi sinh vật trong thực phẩm (xem ví dụ [23]). Việc kiểm tra này hết sức quan trọng nếu nhà sản xuất không có các số liệu đánh giá về các đầu dò này.

Các phòng thử nghiệm cần phải thu được các chứng chỉ kiểm chứng cho mỗi mẻ với việc chỉ rõ các chủng thử nghiệm.

Nhà sản xuất cũng phải quy định các chứng kiểm chứng rằng các phòng thử nghiệm có thể sử dụng để kiểm tra việc bảo quản hiệu quả của các đầu dò nucleic.

12.6 Phương pháp huyết thanh

12.6.1 Yêu cầu chung

Khi cần thử khẳng định bằng huyết thanh, thì tiến hành sau khi đã nhận dạng bằng sinh hoá các khuẩn lạc tách biệt.

12.6.2 Các phép thử ngưng kết trên lam kính

Các phản ứng kháng nguyên-kháng thể tạo ra các tế bào kết thành từng mảng và tạo thành các khối kết bông hoặc các hạt dày đặc. Trong trường hợp các khuẩn lạc thuộc họ *Enterobacteriaceae* thì phản ứng giữa kháng nguyên "H" (nghĩa là kháng nguyên lông) và kháng huyết thanh đồng đẳng tạo ra kết tụ bông, ở đó phản ứng kéo theo kháng nguyên "O" (nghĩa là kháng nguyên thân) tạo ra dày đặc hơn, thành mảng các hạt.

Trước khi dính kết với các kháng huyết thanh, cần thực hiện phép thử để xác định xem các tế bào vi khuẩn có dính kết hay không trong dung dịch natri clorua [3 % (phần khối lượng)]. Nếu các tế bào vi khuẩn có dính kết, thì đó là chủng tự dính kết và không cần phải dính kết với kháng huyết thanh.

Có sẵn hai dạng kháng huyết thanh: kháng huyết thanh đa giá phản ứng với các vi sinh vật thuộc giống đặc hiệu hoặc với các nhóm huyết thanh và thích hợp cho việc sàng lọc sơ bộ và các kháng thể đơn giá, sử dụng để nhận dạng các serovar đặc biệt.

Cần kiểm tra xác nhận rằng các phép thử ngưng kết trên lam kính là thích hợp, như đã được nghiên cứu đánh giá trong các tài liệu khoa học liên quan đến vi sinh vật trong thực phẩm⁵⁾.

Khi sử dụng các thuốc thử, cần sử dụng các kiểm chứng dương tính và âm tính thích hợp.

12.6.3 Phép thử ngưng kết latex

Phương pháp thử nhanh có sẵn trong thương mại, áp dụng các hạt nhựa được phủ các kháng thể nhóm đặc hiệu (ví dụ như *Escherichia coli* O157, xem TCVN 7686 (ISO 16654) hoặc *Staphylococcus aureus* xem TCVN 4830 (ISO 6888)). Kháng nguyên trong dịch chiết được phân tích theo dải các thuốc thử latex.

Cần kiểm tra xác nhận rằng các phép thử ngưng kết latex là thích hợp, như đã được nghiên cứu đánh giá trong các tài liệu khoa học liên quan đến vi sinh vật trong thực phẩm⁵⁾.

Phòng thử nghiệm cần phải thu được các chứng chỉ kiểm chứng cho mỗi mẻ với việc chỉ rõ các chủng thử nghiệm.

Khi sử dụng các thuốc thử, cần sử dụng các kiểm chứng dương tính và âm tính thích hợp.

13 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ phương pháp thử đã sử dụng và nhiệt độ ủ ấm, nếu cần và kết quả thu được. Báo cáo thử nghiệm cũng phải ghi rõ mọi chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả.

Nêu rõ trong báo cáo thử nghiệm các phép thử tiếp theo cần được tiến hành trong phòng thử nghiệm chuẩn hoặc nếu các phép thử đó đã được tiến hành, các kết quả thu được.

Báo cáo thử nghiệm cũng phải bao gồm mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử. Cũng phải bao gồm mọi thông tin cần thiết để diễn giải các kết quả.

Xác định độ không đảm bảo đo theo ISO/TS 19036, nếu cần, cần được nêu trong báo cáo thử nghiệm.

14 Xác nhận tính hiệu lực của các phương pháp

14.1 Xác nhận tính hiệu lực của các phương pháp chuẩn

Xác nhận tính hiệu lực của các phương pháp chuẩn đang được ISO/TC34/SC 9 nghiên cứu.

⁵⁾ Yêu cầu về thông tin được bổ sung từ các tài liệu viện dẫn của quốc gia, vùng hoặc quốc tế đối với việc nhận biết từng vi sinh vật.

14.2 Xác nhận tính hiệu lực của các phương pháp thay thế

Xem ISO 16140 về quy trình kỹ thuật để xác nhận tính hiệu lực của các phương pháp thay thế theo phương pháp chuẩn.

14.3 Xác nhận tính hiệu lực của các phương pháp trong một phòng thử nghiệm

Xác nhận tính hiệu lực của các phương pháp trong một phòng thử nghiệm đang được ISO/TC34/SC 9 nghiên cứu.

15 Đảm bảo chất lượng các kết quả/kiểm soát chất lượng hiệu quả

15.1 Kiểm soát chất lượng nội bộ

15.1.1 Việc kiểm soát chất lượng nội bộ bao gồm tất cả các quy trình được thực hiện bởi phòng thử nghiệm để đánh giá liên tục công việc của phòng thử nghiệm. Mục tiêu chính là để đảm bảo sự thống nhất của các kết quả theo từng ngày và sự phù hợp với tiêu chí xác định.

15.1.2 Chương trình kiểm tra định kỳ cần chứng minh rằng độ dao động (giữa các người phân tích, giữa các thiết bị và giữa các vật liệu) đều được kiểm soát. Tất cả các phép thử cần nằm trong phạm vi hoạt động của phòng thử nghiệm.

Chương trình có thể bao gồm:

- sử dụng các mẫu đã bổ sung vi sinh vật có các mức nhiễm bẩn khác nhau, kể cả hệ sinh vật nền và hệ mục tiêu;
- sử dụng các mẫu đã bổ sung vi sinh vật/nhiễm bẩn tự nhiên từ dải chất nền;
- sử dụng chất chuẩn (kể cả thử nghiệm thành thạo vật liệu phối hợp);
- thử nghiệm lặp lại;
- đánh giá lặp lại các kết quả thử nghiệm.

Khoảng thời gian giữa các lần kiểm tra này bị ảnh hưởng bởi bản chất của phép thử được thực hiện trong phòng thử nghiệm và tần số của các phép thử nghiệm.

Khuyến cáo các phép thử nghiệm nên kết hợp với các phép kiểm chứng để kiểm tra hiệu quả, nếu có thể.

15.1.3 Trong các trường hợp đặc biệt, chỉ hiếm khi phòng thử nghiệm có thể thực hiện phép thử đặc trưng. Người ta cho thấy rằng trong các trường hợp đó, có thể kết hợp chương trình kiểm soát chất lượng nội bộ đang thực hiện và sơ đồ chứng minh hiệu quả thích hợp được tiến hành song song với phép thử có thể thích hợp hơn.

15.2 Các chứng chuẩn

Xem ISO/TS 11133 về việc duy trì các chứng chuẩn.

15.3 Đánh giá chất lượng bên ngoài (thử nghiệm thành thạo)

Các phòng thử nghiệm cần định kỳ tham gia vào các quy trình thử nghiệm thành thạo có liên quan đến phạm vi hoạt động. Cần ưu tiên các sơ đồ kiểm tra hiệu quả sử dụng các chất nền thích hợp.

Các phòng thử nghiệm cần được đánh giá chất lượng từ bên ngoài không chỉ để đánh giá độ lệch của phòng thử nghiệm và còn để kiểm tra tính hiệu lực của hệ thống chất lượng toàn diện của các phòng thử nghiệm.

Phụ lục A

(tham khảo)

Tính chất của một số chất tẩy rửa

Bảng A.1 – Tính chất của một số chất tẩy rửa

Chất tẩy rửa	Tác động chống lại							Khử hoạt tính					Độc tính		
	Nấm	Vi khuẩn		Vi khuẩn nấm	Bào tử	Virus lipid	Vi rút không lipid	Protein	Chất tự nhiên	Chất tổng hợp	Nước cứng	Chất tẩy rửa	Da	Mắt	Phổi
		Gram dương	Gram âm												
Hypoclorit	+	+++	+++	++	++	+	+	+++	+	+	+	C	+	+	+
Rượu	-	+++	+++	+++	-	+	V	+	+	+	+	-		+	
Formaldehyt	+++	+++	+++	+++	+++ ^a	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Glutaraldehyt	+++	+++	+++	+++	+++ ^b	+	+	NA	+	+	+	NA	+++	+++	+++
Iodopho	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+	+	+	A	+	+	-

+++ tốt;
 ++ hợp lý;
 + không đáng kể;
 - không có;
 V tùy thuộc vào virus;
 C cation;
 A anion;
 NA không thích hợp;
^a trên 40 °C;
^b trên 20 °C;

Nguồn gốc: Tham khảo [17].

Phụ lục B

(quy định)

Xác định số có xác suất lớn nhất (MPN)**Bảng B.1 – Các giá trị MPN trên phần mẫu thử và các giới hạn tin cậy 95 % đối với dây 10 ống, được tính theo [29]**

Số lượng ống dương tính	Dây 10 ống			
	MPN	Độ không đảm bảo chuẩn của \log_{10} MPN	Giới hạn 95 %	
			Dưới	Trên
1	0,11	0,435	0,02	0,75
2	0,22	0,308	0,06	0,89
3	0,36	0,252	0,11	1,11
4	0,51	0,220	0,19	1,38
5	0,69	0,198	0,28	1,69
6	0,92	0,184	0,40	2,10
7	1,20	0,174	0,55	2,64
8	1,61	0,171	0,75	3,48
9	2,30	0,179	1,03	5,16

Bảng B.2 – Các giá trị MPN trên phần mẫu thử và các giới hạn tin cậy 95 % đối với dây 15 ống, được tính theo [29]

Số lượng ống dương tính	Dây 15 ống			
	MPN	Độ không đảm bảo chuẩn của \log_{10} MPN	Giới hạn 95 %	
			Dưới	Trên
1	0,07	0,434	0,01	0,49
2	0,14	0,307	0,04	0,57
3	0,22	0,251	0,07	0,69
4	0,31	0,218	0,12	0,83
5	0,41	0,196	0,17	0,98
6	0,51	0,179	0,23	1,15
7	0,63	0,167	0,30	1,33
8	0,76	0,157	0,37	1,55
9	0,92	0,150	0,47	1,80
10	1,10	0,144	0,57	2,11
11	1,32	0,141	0,70	2,49
12	1,61	0,139	0,86	3,02
13	2,01	0,142	1,06	3,82
14	2,71	0,155	1,35	5,45

Bảng B.3 – Các giá trị MPN trên phần mẫu thử và các giới hạn tin cậy 95 % đối với dây 20 ống, được tính theo [29]

Số lượng ống dương tính	Dây 20 ống			
	MPN	Độ không đảm bảo chuẩn của \log_{10} MPN	Giới hạn 95 %	
			Dưới	Trên
1	0,05	0,434	0,01	0,36
2	0,11	0,307	0,03	0,42
3	0,16	0,251	0,05	0,50
4	0,22	0,218	0,08	0,60
5	0,29	0,195	0,12	0,69
6	0,36	0,178	0,16	0,80
7	0,43	0,165	0,20	0,91
8	0,51	0,155	0,25	1,03
9	0,59	0,147	0,31	1,16
10	0,69	0,140	0,37	1,30
11	0,80	0,134	0,44	1,46
12	0,92	0,130	0,51	1,65
13	1,05	0,126	0,59	1,85
14	1,20	0,123	0,69	2,10
15	1,39	0,121	0,80	2,40
16	1,61	0,121	0,93	2,77
17	1,90	0,122	1,09	3,29
18	2,30	0,127	1,30	4,08
19	3,00	0,141	1,58	5,67

Bảng B.4 – Các giá trị MPN trên phần mẫu thử và các giới hạn tin cậy 95 % đối với dãy 25 ống, được tính theo [29]

Số lượng ống dương tính	Dãy 25 ống			
	MPN	Độ không đảm bảo chuẩn của \log_{10} MPN	Giới hạn 95 %	
			Dưới	Trên
1	0,04	0,434	0,01	0,29
2	0,08	0,307	0,02	0,33
3	0,13	0,251	0,04	0,40
4	0,17	0,217	0,07	0,47
5	0,22	0,195	0,09	0,54
6	0,27	0,178	0,12	0,61
7	0,33	0,165	0,16	0,69
8	0,39	0,154	0,19	0,77
9	0,45	0,146	0,23	0,86
10	0,51	0,139	0,27	0,96
11	0,58	0,133	0,32	1,06
12	0,65	0,128	0,37	1,16
13	0,73	0,123	0,42	1,28
14	0,82	0,119	0,48	1,41
15	0,92	0,116	0,54	1,55
16	1,02	0,113	0,61	1,70
17	1,14	0,111	0,69	1,88
18	1,27	0,109	0,78	2,09
19	1,43	0,108	0,88	2,33
20	1,61	0,108	0,99	2,62
21	1,83	0,109	1,12	2,99
22	2,12	0,111	1,29	3,50
23	2,53	0,117	1,49	4,28
24	3,22	0,123	1,77	5,85

Bảng B.5 – Chỉ số MPN và giới hạn tin cậy (95 %) khi sử dụng ba phần mẫu thử 1 g (ml), ba phần mẫu thử 0,1 g (ml) và ba phần mẫu thử 0,01 g (ml)

Số lượng kết quả dương tính			Chỉ số ^a MPN	Cấp ^b	Giới hạn tin cậy (95 %) ^{a, c}	
					Giới hạn dưới	Giới hạn trên
0	0	0	< 0,30		0,00	0,94
0	0	1	0,30	3	0,01	0,95
0	1	0	0,30	2	0,01	1
0	1	1	0,61	0	0,12	1,7
0	2	0	0,62	3	0,12	1,7
0	3	0	0,94	0	0,35	3,5
1	0	0	0,36	1	0,02	1,7
1	0	1	0,72	2	0,12	1,7
1	0	2	1,1	0	0,4	3,5
1	1	0	0,74	1	0,13	2
1	1	1	1,1	3	0,4	3,5
1	2	0	1,1	2	0,4	3,5
1	2	1	1,5	3	0,5	3,8
1	3	0	1,6	3	0,5	3,8
2	0	0	0,92	1	0,15	3,5
2	0	1	1,4	2	0,4	3,5
2	0	2	2,0	0	0,5	3,8
2	1	0	1,5	1	0,4	3,8
2	1	1	2,0	2	0,5	3,8
2	1	2	2,7	0	0,9	9,4
2	2	0	2,1	1	0,5	4
2	2	1	2,8	3	0,9	9,4
2	2	2	3,5	0	0,9	9,4
2	3	0	2,9	3	0,9	9,4
2	3	1	3,6	0	0,9	9,4
3	0	0	2,3	1	0,5	9,4
3	0	1	3,8	1	0,9	10,4
3	0	2	6,4	3	1,6	18,1
3	1	0	4,3	1	0,9	18,1
3	1	1	7,5	1	1,7	19,9
3	1	2	12	3	3	36
3	1	3	16	0	3	38
3	2	0	9,3	1	1,8	36
3	2	1	15	1	3	38
3	2	2	21	2	3	40
3	2	3	29	3	9	99
3	3	0	24	1	4	99
3	3	1	46	1	9	198
3	3	2	110	1	20	400
3	3	3	> 110			

^a Nguồn gốc: tham khảo [27].

^b Xem Bảng B.6.

^c Giới hạn tin cậy đưa ra trong bảng này chỉ có ý định cung cấp một số khái niệm về ảnh hưởng của biến thiên thống kê trên kết quả. Luôn luôn có các nguồn biến thiên khác mà đôi lúc cũng có thể có nghĩa.

Bảng B.6 – Giải thích các cấp kết quả

Cấp	Định nghĩa
1	Khi số lượng vi sinh vật trong sản phẩm đúng bằng MPN tìm được, thì kết quả là một trong các số mà có khả năng cao nhất thu được. Hầu như chỉ có 5 % trường hợp thu được kết quả ít xảy ra hơn xác suất nhỏ nhất ở cấp này.
2	Khi số lượng vi sinh vật trong sản phẩm đúng bằng MPN tìm được, kết quả là một trong các số ít có khả năng hơn để thu được, ngay cả số xác suất thấp ít xảy ra nhất trong cấp 1, nhưng tối đa chỉ được có 1% khả năng thu được một kết quả xác suất thấp hơn, mà khả năng này xác suất nhỏ nhất ở cấp này.
3	Khi số lượng vi sinh vật trong sản phẩm đúng bằng MPN tìm được, kết quả là một trong các số mà ít có khả năng thu được hơn, ngay cả số đó có thể ít xảy ra nhất trong cấp 2, nhưng tối đa chỉ có 0,1% khả năng thu được của kết quả ít có thể xảy ra hơn xác suất nhỏ nhất ở cấp này.
4	Khi số lượng vi sinh vật trong sản phẩm đúng bằng MPN tìm được, kết quả là một trong các số mà ít có khả năng thu được hơn, ngay cả số xác suất thấp nhất trong cấp 3. Chỉ có khả năng 0,1% thu được một kết quả ở cấp này mà không có bất kỳ một nhầm lẫn nào.
<p>Trước khi bắt đầu kiểm tra, cần quyết định xem cấp nào sẽ được chấp nhận, đó là: chỉ cấp 1, 1 và 2 hoặc kể cả 1, 2 và 3. Khi quyết định được dựa trên cơ sở của kết quả, thì điều quan trọng là chỉ được chấp nhận kết quả của cấp 1 hoặc tối đa kết quả của cấp 1 và 2. Kết quả của cấp 1 cần được xem xét hết sức cẩn thận.</p>	

**Bảng 7 – Các giá trị MPN trên gam mẫu và các giới hạn tin cậy 95 % (khi sử dụng năm phần mẫu
thứ 1 g, năm phần mẫu thứ 0,1 g và năm phần mẫu thứ 0,01 g)**

Số lượng ống cho phản ứng dương tính			MPN (trên g)	95 % giới hạn tin cậy	
5 trong 1 g	5 trong 0,1 g	5 trong 0,01 g		Dưới	Trên
0	0	0	< 0,2	< 0,1	0,7
0	1	0	0,2	< 0,1	0,7
0	2	0	0,4	< 0,1	1,1
1	0	0	0,2	< 0,1	0,7
1	0	1	0,4	< 0,1	1,1
1	1	0	0,4	< 0,1	1,1
1	1	1	0,6	< 0,1	1,5
2	0	0	0,5	< 0,1	1,3
2	0	1	0,7	0,1	1,7
2	1	0	0,7	0,1	1,7
2	1	1	0,9	0,2	2,1
2	2	0	0,9	0,2	2,1
2	3	0	1,2	0,3	2,8
3	0	0	0,8	0,1	1,9
3	0	1	1,1	0,2	2,5
3	1	0	1,1	0,2	2,5
3	1	1	1,4	0,4	3,4
3	2	0	1,4	0,4	3,4
3	2	1	1,7	0,5	4,6
3	3	0	1,7	0,5	4,6
4	0	0	1,3	0,3	3,1
4	0	1	1,7	0,5	4,6
4	1	0	1,7	0,5	4,6
4	1	1	2,1	0,7	6,3
4	1	2	2,6	0,9	7,8

Bảng 7 – (kết thúc)

Số lượng ống cho phản ứng dương tính			MPN (trên g)	95 % giới hạn tin cậy	
5 trong 1 g	5 trong 0,1 g	5 trong 0,01 g		Dưới	Trên
4	2	0	2,2	0,7	6,7
4	2	1	2,6	0,9	7,8
4	3	0	2,7	0,9	8
4	3	1	3,3	1,1	9,3
4	4	0	3,4	1,2	9,3
5	0	0	2,3	0,7	7
5	0	1	3,1	1,1	8,9
5	0	2	4,3	1,5	11
5	1	0	3,3	1,1	9,3
5	1	1	4,6	1,6	12
5	1	2	6,3	2,1	15
5	2	0	4,9	1,7	13
5	2	1	7	2,3	17
5	2	2	9,4	2,8	22
5	3	0	7,9	2,5	19
5	3	1	11	3,1	25
5	3	2	14	3,7	34
5	3	3	18	4,4	50
5	4	0	13	3,5	30
5	4	1	17	4,3	49
5	4	2	22	5,7	70
5	4	3	28	9	85
5	4	4	35	12	100
5	5	0	24	6,8	75
5	5	1	35	12	100
5	5	2	54	18	140
5	5	3	92	30	320
5	5	4	160	64	580
5	5	5	> 180	-	-

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] BELL, C. NEAVES, P. and WILLIAMS, A.P. *Food microbiology and laboratory practice*, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK (2005)
- [2] ISO 9001, *Quality management systems – Requirements*
- [3] *EA-Guidelines for the use of computers and computer systems in accredited laboratories*, European cooperation for Accreditation (1998)
- [4] *EA-4/10, Accreditation for microbiological laboratories*, European cooperation for Accreditation (2002)
- [5] *Food microbiology program requirements*, based upon the FLAWG document *United States accreditation criteria for laboratories performing food microbiological testing*, American Association for Laboratory Accreditation (A2LA) (1998)
- [6] AS 1766, *Australian standard methods for the microbiological examination of food – Part 1: General techniques and procedures update*
- [7] BUTTIAUX, R., BEERENS, H. and TACQUET, A. *Manuel de techniques bacteriologiques*, Editions Medicales Flammarion (4th edn.)
- [8] APHA Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 2nd edition, Speck, M.L., editor. Intersociety/Agency Committee on Microbiological Methods for Foods, American Public Health Association, Washington, DC, 1984
- [9] CRUICKSHANK *et al.*, *Medical microbiology*, Vol. 2, 12th edn., Churchill-Livingstone, Edinburgh (1975)
- [10] D'AOUST, J.Y. Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. *Int. J. Food. Microbiol.* 1991, 13, pp. 207-16
- [11] D'AOUST, J.Y., SEWELL, A.M. and McDONALD, C. Recovery of *Salmonella* spp. from refrigerated pre-enrichment cultures of dry food composites. *J. AOAC Int.* 1995, 78, pp. 1322-7
- [12] D'AOUST, J.Y., SEWELL, A.M. and GRECO, P. Detection of *Salmonella* in dry foods using refrigerated pre-enrichment and enrichment broth cultures: summary of collaborative study. *J. AOAC Int.* 1994, 77, pp. 1490-1
- [13] D'AOUST, J.Y., SEWELL, A.M. and GRECO, P. Detection of *Salmonella* in dry foods using refrigerated pre-enrichment and enrichment broth cultures – Interlaboratory study, *J. AOAC Int.* 1993, 76, pp. 814-21.
- [14] DALSGAARD, A., GUARDABASSI, L., LUND, C., BAGGE, L. and GRAVESEN, J. Opbevaring af badevands-og drikkevandsprover ved 0-5 °C i et døgn medfører en signifikant reduktion i antal *Escherichia coli* og kimalt, *Dansk. Vet.* 2002 17, pp. 1-9
- [15] HARREWIJIN, G.A., and HARTOG, B.J. Guidelines to perform microbiological analyses of food and food products ("Good laboratory practice"), *De Ware(n)-Chemicus* 1979, 9, pp. 1-11

- [16] MUIR, G.D., ed. *Hazards in the chemical laboratory*, Royal Institute of Chemistry, London (1971)
- [17] *Laboratory biosafety manual*, WHO, Geneva, 1993
- [18] LIGHTFOOT, N.F., MAIER, E.A. (eds). *Microbiological analysis of food and water – Guidelines for quality assurance*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands (1998)
- [19] HARRIGAN, W.F. and MCCANCE, M.E. *Laboratory methods in food and dairy microbiology*, Academic Press (1976)
- [20] *Laboratory safety at the Centers for Disease Control (CDC)*, NHEW Publication No. CDC 79-8118, Atlanta, 1979
- [21] *Laboratory safety at the Centers for Disease Control*, US Dept of Health, Education and Welfare (Public Health Service), Atlanta, 1979
- [22] GERHARDT, P., MURRAY, R.G.E., COSTILLOW, R.N., NESTER, E.W., KRIEG, N.R. and PHILLIPS, G.B. eds. *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC 20006 (1981)
- [23] GNANOU BESSE, N., AUDINET, N., BEAUFORT, A., COLIN, P., CORNU, M. and LOMBARD, B. A contribution to the improvement of *Listeria monocytogenes* enumeration in cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 91, pp. 119-27
- [24] *Microbiological testing laboratory accommodation guidelines*, National Association of Testing Authorities, Australia
- [25] *Microorganisms in foods – 1; Their significance and methods of enumeration*, ICMSF, University of Toronto Press (1968 update)
- [26] SHAPTON, DA, BOARD, R.G. and HAUSTER, W.J. eds. *Safety in microbiology*, Society for Applied Bacteriology Technical Series No. 1 and No. 6, Academic Press (1972)
- [27] DE MAN, J.C. MPN tables (corrected), *Eur. J. Appl. Biotechnol.* 1983, 17, pp. 301-5
- [28] COCHRAN, W.G. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". *Biometrics* 1950, 6, pp. 105-16
- [29] HURLEY, M.A. and ROSCOE, M.E. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series, *J. Appl. Bacteriol.* 1983, 55, pp. 159-64
- [30] NIEMELA, S. *Statistical evaluation of results from quantitative microbiological examinations*, Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) Report No. 1, 2nd edition (1983)
- [31] TAYLOR, J. The estimation of numbers of bacteria by tenfold dilution series, *J. Appl. Bacteriol.* 1962, 25, pp. 54-61
- [32] HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. and WILLIAMS, ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th edn., Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1994)
- [33] KRIEG, N.R. and HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology – Volume 1*, Williams &

TCVN 6404:2008

Wilkins, Baltimore, MD, USA (1984)

- [34] SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. and HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology – Volume 2*, 2nd edition, Springer, New York, NY, 2001
- [35] KREGER-VAN RIJ, N.J.W. *The yeasts – A taxonomic study*, 3rd edn., North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Netherlands
- [36] THOMAS, H.A. Bacterial densities from fermentation tube tests, *J. Am. Water Works Assoc.* 1942, 34, pp. 572-6
- [37] ISO/IEC Guide 43-1, *Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes*
- [38] ISO 6888 (all parts), *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species)*
- [39] ISO 9998, *Water quality – Practices for evaluating and controlling microbiological colony count media used in water quality tests*
- [40] ISO/TR 13843, *Water quality – Guidance on validation of microbiological methods*
- [41] ISO 14461-1, *Milk and milk products – Quality control in microbiological laboratories – Part 1: Analyst performance assessment for colony counts*
- [42] ISO 14461-2, *Milk and milk products – Quality control in microbiological laboratories – Part 2: Determination of the reliability of colony counts of parallel plates and subsequent dilution steps*
- [43] ISO 16654, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Escherichia coli 0157*
- [44] ISO/IEC 17025:2005, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*
- [45] EN 12469, *Biotechnology – Performance criteria for microbiological safety cabinets*
- [46] ISO 17604, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Carcass sampling for microbiological analysis*
- [47] ISO 18593, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for sampling techniques from surfaces using contact plates and swab methods*
- [48] ISO Guide 99:1996, *International vocabulary of basic and general terms in metrology*
- [49] ISO/TC 34/SC 9 N852, *Supporting document on the change from two to one plate per dilution for colony-count techniques (revision of ISO 7218)*, June 2007, Marie Cornu