

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 4991 : 2005

ISO 7937 : 2004

Xuất bản lần 2

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN
CHĂN NUÔI – PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TRÊN ĐĨA THẠCH –
KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for
the enumeration of Clostridium perfringens – Colony count technique*

Lời giới thiệu

Do tính đa dạng của thực phẩm và thức ăn chăn nuôi nên phương pháp này có thể không thích hợp đến từng chi tiết cho từng sản phẩm cụ thể. Trong trường hợp này, có thể sử dụng các phương pháp khác đặc trưng cho từng sản phẩm, nếu hoàn toàn chỉ vì lý do kỹ thuật. Tuy nhiên, cần cố gắng áp dụng phương pháp này khi có thể.

Khi tiêu chuẩn này được soát xét tiếp thì cần phải tính đến mọi thông tin liên quan đến phạm vi mà phương pháp đếm đĩa này phải tuân theo và các nguyên nhân gây sai lệch so với phương pháp trong trường hợp các sản phẩm cụ thể.

Việc hài hoà các phương pháp thử có thể không thực hiện được ngay và đối với một vài nhóm sản phẩm có thể tồn tại các tiêu chuẩn quốc tế và/hoặc tiêu chuẩn quốc gia mà không phù hợp với tiêu chuẩn này. Trong trường hợp có sẵn tiêu chuẩn quốc tế cho sản phẩm cần thử nghiệm thì phải tuân theo tiêu chuẩn đó. Hy vọng rằng khi các tiêu chuẩn như thế được soát xét, thì chúng phải được sửa đổi để phù hợp với tiêu chuẩn này, sao cho cuối cùng chỉ còn các sai lệch với phương pháp đếm đĩa này là các lý do kỹ thuật được thừa nhận.

**Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi –
Phương pháp định lượng *Clostridium perfringens*
trên đĩa thạch – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for
the enumeration of Clostridium perfringens – Colony count technique*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng *Clostridium perfringens* có khả năng mọc trên đĩa thạch. Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho:

- các sản phẩm dùng cho con người và thức ăn cho động vật, và
- các mẫu môi trường trong khu vực sản xuất và xử lý thực phẩm.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 6507-1 (ISO 6887-1). Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật. Phần 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân.

TCVN 4991 : 2005

TCVN 6507-2 (ISO 6887-2), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật. Phần 2: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thịt và sản phẩm thịt.

TCVN 6507-3 (ISO 6887-3), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật. Phần 3: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thủy sản và sản phẩm thủy sản.

TCVN 6507-4 (ISO 6887-4), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật. Phần 4: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các sản phẩm khác với sữa và sản phẩm sữa, thịt và sản phẩm thịt, thủy sản và sản phẩm thủy sản.

TCVN 6404 (ISO 7218), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn chăn nuôi – Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6263 (ISO 8261), Sữa và các sản phẩm sữa. Chuẩn bị mẫu thử và các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh.

ISO/TS 11133-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và tạo môi trường cấy – Phần 1: Các hướng dẫn chung về đảm bảo chất lượng cho việc chuẩn bị môi trường cấy trong phòng thử nghiệm).

ISO/TS 11133-2 : 2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và tạo môi trường cấy – Phần 2: Các hướng dẫn thực hành về thử tính năng của môi trường cấy).

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Clostridium perfringens (C.perfringens) (Clostridium perfringens)

vi khuẩn hình thành các khuẩn lạc điển hình (kết tủa đen, do khử sunfit thành sunfua, làm cho màu khuẩn lạc bị đen) trong môi trường chọn lọc và cho các phản ứng khẳng định dương tính khi thử bằng một trong hai kỹ thuật qui định trong tiêu chuẩn này.

3.2

định lượng *C.perfringens* (enumeration of *C.perfringens*)

xác định số lượng vi khuẩn *C.perfringens* mọc trên đĩa thạch và được khẳng định có trong một gam hoặc một mililit mẫu khi phép thử được thực hiện theo phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Các đĩa Petri được cấy một lượng mẫu thử qui định, nếu sản phẩm ban đầu ở dạng lỏng, hoặc một lượng huyền phù ban đầu qui định nếu các sản phẩm ở dạng khác.

Đối với các đĩa Petri khác, trong cùng một điều kiện, sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu.

Rót môi trường chọn lọc (kỹ thuật rót đĩa) và sau đó phủ lên trên bằng chính môi trường này.

4.2 Ủ trong điều kiện kỵ khí các đĩa ở 37 °C trong 20 h ± 2 h .

4.3 Định lượng các khuẩn lạc điển hình.

4.4 Khẳng định số lượng các khuẩn lạc điển hình và tính số lượng *C.perfringens* có trong một gam hoặc một mililit mẫu.

5 Dịch pha loãng, môi trường cấy và thuốc thử

Xem TCVN 6404 (ISO 7218), ISO/TS 11133-1 và ISO/TS 11133-2 để chuẩn bị và kiểm tra tính năng môi trường cấy.

5.1 Dịch pha loãng

Xem phản tương ứng của TCVN 6507 (ISO 6887) hoặc TCVN 6263 (ISO 8261).

5.2 Môi trường thạch sunfit xycloserin (SC)

CHÚ THÍCH: Loại thạch này được chỉ rõ từ đầu "TSC không chứa lòng đỏ trứng" (xem [1]).

5.2.1 Môi trường cơ bản**5.2.1.1 Thành phần**

Pepton từ protein	15,0 g
Pepton từ đậu tương	5,0 g
Cao nấm men	5,0 g
Dinatri disunfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), dạng khan	1,0 g
Amoni sắt (III) xitrat ^a	1,0 g
Thạch	9,0 g đến 18,0 g ^b
Nước	1 000 ml

^a Thuốc thử này phải chứa ít nhất 15 % (phần khối lượng) sắt.

^b Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

5.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước bằng cách đun sôi. Chính pH sao cho sau khi khử trùng là $7,6 \pm 0,2$ ở 25°C . Phân phối môi trường cơ bản vào các bình hoặc chai có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121°C . Bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$. Môi trường chỉ được sử dụng trong vòng 2 tuần sau khi chuẩn bị.

Trong một số trường hợp (xem 9.4.3.1), có thể cần phải chuẩn bị các đĩa môi trường cơ bản thạch SC để khẳng định với môi trường nitrat để thử tính di động (5.5) và môi trường lactoza-gelatin (5.8). Đối với mục đích này, chuyển các phần khoảng 15 ml môi trường cơ bản [đã được làm tan chảy và được làm nguội đến khoảng 44°C đến 47°C trong nồi cách thuỷ (6.10)] sang các đĩa Petri và để cho đông đặc lại. Làm khô đĩa (xem TCVN 6404 (ISO 7218) ngay trước khi sử dụng.

5.2.2 Dung dịch D-Xycloserin**5.2.2.1 Thành phần**

D-Xycloserin ^a	4,0 g
Nước	100 ml

^a Chỉ sử dụng bột tinh thể trắng.

5.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan D-xyloserin trong nước và lọc dung dịch để khử trùng.

Bảo quản trong tủ lạnh ở $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Môi trường chỉ được sử dụng trong vòng 4 tuần sau khi chuẩn bị.

5.2.3 Môi trường hoàn chỉnh

Ngay trước khi sử dụng trong phương pháp rót đĩa (xem 9.2), cứ 100 ml môi trường cơ bản tan chảy vô trùng (5.2.1) đã được làm nguội đến $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ thì thêm 1 ml dung dịch D-xyloserin (5.2.2).

5.2.4 Thử tính năng để đảm bảo chất lượng môi trường SC

Để xác định tính chọn lọc và năng suất, xem ISO/TS 11133-1. Để kiểm tra tính năng, xem ISO/TS 11133-2 : 2003, Bảng B.1 [xem TS(C)].

5.3 Môi trường thioglycolat lỏng

5.3.1 Thành phần

Pepton từ casein	15,0 g
L-Xystin	0,5 g
D-Glucoza	5,5 g
Cao nấm men	5,0 g
Natri clorua	2,5 g
Natri thioglycolat (mercaptoaxetat)	0,5 g
Thạch	0,5 g đến 2,0 g ^a
Resazurin	0,001 g
Nước	1 000 ml

^a Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

5.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước bằng cách đun sôi. Chính pH sao cho sau khi khử trùng là $7,1 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Phân phối các phần 10 ml vào các ống nghiệm và khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121°C .

TCVN 4991 : 2005

Trước khi sử dụng, môi trường này phải được khử khí.

5.3.3 Thử tính năng để đảm bảo chất lượng môi trường thioglycolat

Để xác định tính chọn lọc và năng suất, xem ISO/TS 11133-1. Để kiểm tra tính năng, xem ISO/TS 11133-2 : 2003, Bảng B.4.

5.4 Môi trường lactoza sunfit (LS) (tùy chọn)

5.4.1 Môi trường cơ bản

5.4.1.1 Thành phần

Pepton từ casein	5,0 g
Cao nấm men	2,5 g
Natri clorua	2,5 g
Lactoza	10 g
L-Xystin hydroclorua	0,3 g
Nước	1 000 ml

5.4.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước bằng cách đun sôi (nếu cần). Chính pH sao cho sau khi khử trùng là $7,1 \pm 0,2$ ở 25°C .

Phân phối vào các ống nghiệm có ống Durham (6.7) mỗi ống 8 ml môi trường và khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121°C .

Môi trường này có thể bảo quản đến 4 tuần ở $3^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

5.4.2 Dung dịch dinatri disunfit

5.4.2.1 Thành phần

Dinatri disunfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), dạng khan	1,2 g
Nước	100 ml

5.4.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan dinatri disunfit trong nước và lọc để khử trùng.

Sử dụng dung dịch trong ngày.

5.4.3 Dung dịch amoni sắt (III) xitrat

5.4.3.1 Thành phần

Amoni sắt (III) xitrat	1 g
Nước	100 ml

5.4.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan amoni sắt (III) xitrat trong nước và lọc để khử trùng.

Sử dụng dung dịch trong ngày.

5.4.4 Môi trường hoàn chỉnh

Nếu môi trường không sử dụng trong ngày chuẩn bị, thì ngay trước khi kết thúc chuẩn bị, khử khí môi trường bằng cách đun nóng và làm nguội nhanh. Nếu môi trường đựng trong các chai có nắp vận thì nới lỏng nắp trước khi gia nhiệt và vận chặt lại ngay trước khi làm nguội.

Cứ 8 ml môi trường cơ bản (5.4.1) thì bổ sung 0,5 ml dung dịch dinatri disunfit (5.4.2) và 0,5 ml dung dịch amoni sắt (III) xitrat (5.4.3).

Sử dụng dung dịch hoàn chỉnh trong ngày.

5.5 Môi trường nitrat để thử tính di động (tùy chọn)

5.5.1 Thành phần

Pepton từ casein	5,0 g
Cao thịt	3,0 g
Galactoza	5,0 g
Glyxerol	5,0 g
Kali nitrat (KNO_3)	1,0 g
Dinatri hidro octophosphat (Na_2HPO_4)	2,5 g
Thạch	1,0 g đến 5,0 g ^a
Nước	1 000 ml

^a Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

TCVN 4991 : 2005

5.5.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước bằng cách đun sôi. Chính pH sao cho sau khi khử trùng là $7,3 \pm 0,2$ ở 25°C .

Chuyển môi trường vào các ống cấy, với các lượng 10 ml và khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121°C . Nếu không sử dụng trong ngày thì bảo quản trong tủ lạnh ở $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$. Chỉ ngay trước khi sử dụng, làm nóng trên nồi cách thuỷ hoặc bằng hơi nước trong 15 phút và làm nguội nhanh đến nhiệt độ ủ.

Môi trường chỉ được sử dụng trong vòng 4 tuần sau khi chuẩn bị.

5.6 Thuốc thử để phát hiện nitrit (tùy chọn)

5.6.1 Dung dịch axit 5-Amino-2-naphthalenesulfonic (5-2-ANSA)

Hoà tan 0,1 g 5-2-ANSA trong 100 ml dung dịch axit axetic 15 % (phần khối lượng). Lọc qua giấy lọc.

Bảo quản trong chai màu nâu có nắp đậy kín (tốt nhất là loại ống nhỏ giọt quả bóp) ở $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

5.6.2 Dung dịch axit sunfanilic

Hoà tan 0,4 g axit sunfanilic trong 100 ml dung dịch axit axetic 15 % (phần khối lượng). Lọc qua giấy lọc.

Bảo quản trong chai màu nâu có nắp đậy kín (tốt nhất là loại ống nhỏ giọt quả bóp) ở $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

5.6.3 Chuẩn bị thuốc thử hoàn chỉnh

Trước khi sử dụng, trộn lẫn hai dung dịch (5.6.1 và 5.6.2) với các lượng bằng nhau. Loại bỏ ngay thuốc thử không sử dụng.

5.7 Bụi kềm (tùy chọn).

5.8 Môi trường lactoza-gelatin (tùy chọn)

5.8.1 Thành phần

Pepton từ casein	15,0 g
Cao nấm men	10,0 g
Lactoza	10,0 g
Gelatin	120,0 g
Phenol đỏ	0,05 g
Nước	

5.8.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước, trừ lactoza và phenol đỏ. Chính pH sao cho sau khi khử trùng là $7,5 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Bổ sung tiếp lactoza và phenol đỏ, phân phối vào các ống nghiệm các lượng 10 ml và khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121°C . Nếu không sử dụng trong ngày thì bảo quản trong tủ lạnh ở $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ngay trước khi sử dụng, đun nóng trong nồi cách thủy hoặc thổi bằng hơi nước trong 15 phút và làm nguội nhanh đến nhiệt độ ủ.

Môi trường chỉ được sử dụng trong vòng 3 tuần sau khi chuẩn bị.

6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Sử dụng các thiết bị của phòng thử nghiệm vi sinh thông thường [xem TCVN 6404 (ISO 7218)] và cụ thể là:

6.1 Thiết bị để khử trùng khô (lò sấy) hoặc để khử trùng ướt (nồi hấp áp lực)

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.2 Tủ ấm, có khả năng hoạt động ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.3 Bình không khí cài biến, hoặc các dụng cụ thích hợp khác để cấy kỵ khí.

6.4 pH mét, có thể đọc chính xác đến $\pm 0,01$ đơn vị pH ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, có thể cho các phép đo chính xác đến 0,1 đơn vị pH.

6.5 Que cấy vòng, bằng platin-iridi hoặc niken-crôm, đường kính khoảng 3 mm, và các kim cấy sâu bằng cùng vật liệu hoặc các que cấy vòng và kim cấy vô trùng sử dụng một lần có chất lượng tương đương.

6.6 Dụng cụ lọc, để khử trùng các dung dịch.

6.7 Ống nghiệm, bình hoặc chai có dung tích thích hợp, cụ thể là các ống nghiệm 16 mm x 160 mm có các ống Durham lộn ngược, ví dụ: dài 35 mm và đường kính 7 mm.

6.8 Pipet hoặc micropipet chia độ xả hết, có dung tích danh định 1 ml và 10 ml, được chia vạch 0,1 ml và 0,5 ml tương ứng.

6.9 Đĩa Petri, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo có đường kính 90 mm đến 100 mm.

6.10 Nồi cách thủy, hoặc thiết bị tương tự có thể hoạt động ở $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ và ở $46\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$

TCVN 4991 : 2005

6.11 Bầu cao su, để sử dụng với pipet chia độ khi phân phối các thành phần của thuốc thử phát hiện nitrit (nếu cần).

7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn riêng về lấy mẫu cho sản phẩm tương ứng. Nếu chưa có tiêu chuẩn riêng thì các bên liên quan tự thoả thuận với nhau về vấn đề này.

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

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6507-2 (ISO 6887-2), TCVN 6507-3 (ISO 6887-3), TCVN 6507-4 (ISO 6887-4) hoặc TCVN 6263 (ISO 8261).

9 Cách tiến hành

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

Xem các phần tương ứng của TCVN 6507 (ISO 6887) và tiêu chuẩn riêng liên quan tới sản phẩm.

9.2 Cấy và ủ (kỹ thuật rót đĩa)

Dùng pipet vô trùng (6.8) cho vào mỗi đĩa 1 ml mẫu thử nếu sản phẩm ở dạng lỏng hoặc 1 ml huyền phù ban đầu cho vào chính giữa hai đĩa Petri trống (6.9).

Rót vào mỗi đĩa 10 ml đến 15 ml thạch SC (5.2.3), được duy trì ở 44 °C đến 47 °C trong nồi cách thuỷ (6.10) và trộn đều chất cấy bằng cách xoay nhẹ từng đĩa. Khi môi trường đã đông đặc lại thì phủ kín thêm một lớp dày 10 ml của cùng loại thạch SC.

Để cho đông đặc lại. Đặt các đĩa vào các bình môi trường cải biến hoặc các vật đựng thích hợp khác (6.3) và ủ trong các điều kiện kỵ khí ở 37 °C trong 20 h ± 2 h. Thời gian ủ kéo dài có thể làm cho các đĩa bị quá đen.

Tiến hành qui trình tương tự đối với các dung dịch pha loãng đã chuẩn bị (xem 9.1).

9.3 Đếm và chọn các khuẩn lạc

Sau giai đoạn ủ qui định (9.2), chọn tất cả các đĩa chứa ít hơn 150 khuẩn lạc. Từ các đĩa này, chọn các đĩa đại diện cho các độ pha loãng liên tiếp, nếu có thể.

Đếm các khuẩn lạc điển hình của *C.perfringens* trên mỗi đĩa.

Chọn năm khuẩn lạc điển hình và khẳng định chúng sử dụng một trong các kỹ thuật mô tả trong 9.4.2 và 9.4.3.

9.4 Khẳng định sinh hoá

9.4.1 Yêu cầu chung

Chọn một trong hai kỹ thuật thử khẳng định như mô tả trong 9.4.2 và 9.4.3.

Có thể sử dụng loại có bán sẵn nếu phù hợp với TCVN 6404 (ISO 7218).

9.4.2 Kỹ thuật khẳng định sử dụng môi trường LS

CHÚ THÍCH: Phản ứng thu được trong môi trường lactoza sunfit (5.4) khi ủ ở 46 °C là rất đặc trưng cho *C.perfringens* và *C.absonum*. Do đó, không cần phải khẳng định sự thuần khiết của các khuẩn lạc màu đen được lấy từ môi trường thạch trước khi cấy vào môi trường thioglycolat và cấy truyền vào môi trường thạch lactoza sunfit nữa.

9.4.2.1 Cấy và ủ

Cấy từng khuẩn lạc đã chọn (xem 9.3) vào môi trường thioglycollat lỏng (5.3). Ủ trong điều kiện kỵ khí ở 37 °C trong 18 h đến 24 h.

Sau khi ủ, dùng pipet vô trùng chuyển ngay 5 giọt dịch cấy trong môi trường thioglycolat sang môi trường LS. Ủ trong các điều kiện hiếu khí ở 46 °C trong 18 h đến 24 h trong nồi cách thuỷ (6.10).

9.4.2.2 Giải thích kết quả

Kiểm tra các ống nghiệm đựng môi trường LS về việc sinh khí và có xuất hiện màu đen (kết tủa của sắt sunfit). Các ống Durham có phần bọt khí chiếm hơn một phần tư chiều dài ống và các ống có kết tủa màu đen được coi là dương tính.

Trong trường hợp có nghi ngờ, khi ống Durham trong môi trường bị đen có phần bọt khí chiếm ít hơn một phần tư chiều dài ống thì dùng pipet vô trùng chuyển ngay 5 giọt đã được phát triển trước trong môi trường LS (9.4.2.1) vào ống khác đựng môi trường LS. Ủ trong nồi cách thuỷ (6.10) đến 46 °C trong 18 h đến 24 h. Kiểm tra ống này như mô tả ở trên.

Vi khuẩn hình thành các khuẩn lạc điển hình trên môi trường thạch SC và được khẳng định dương tính với môi trường LS được coi là *C.perfringens*. Trong các trường hợp khác, các ống được coi là âm tính.

9.4.3 Kỹ thuật khẳng định sử dụng môi trường nitrat để thử tính di động và môi trường lactoza-gelatin

9.4.3.1 Yêu cầu chung

Kỹ thuật khẳng định này đòi hỏi các khuẩn lạc điển hình phân lập tốt. Nếu không phải như thế (nghĩa là bề mặt của các đĩa bị mọc quá dày và không thể chọn các khuẩn lạc điển hình phân lập tốt), thì cấy năm khuẩn lạc điển hình vào môi trường thioglycollat lỏng (5.3) đã khử khí trước.

Ủ trong các điều kiện kỵ khí ở 37 °C trong 18 h đến 24 h. Cấy ria các khuẩn lạc lên các đĩa thạch cơ bản SC (xem 5.2.1.2) và phủ kín thêm 10 ml thạch cơ bản SC.

Để cho đông đặc và ủ kỵ khí ở 37 °C trong 18 h đến 24 h. Chọn từ mỗi đĩa ít nhất một khuẩn lạc điển hình và phân lập tốt. Nếu cần, lặp lại quá trình cấy ria và cấy trên các đĩa môi trường thạch cơ bản SC cho đến khi thu được các khuẩn lạc đen điển hình phân lập tốt.

Khẳng định khuẩn lạc này như mô tả trong 9.4.3.2, 9.4.3.3 và 9.4.3.4.

9.4.3.2 Cấy và đọc trên môi trường nitrat để thử tính di động

Cấy đâm sâu từng khuẩn lạc chọn lọc (xem 9.3) sang môi trường nitrat để thử tính di động (5.5) mới khử khí.

Ủ trong các điều kiện kỵ khí ở 37 °C trong 24 h. Kiểm tra ống môi trường nitrat để thử tính di động đối với loại mọc dọc theo đường cấy đâm sâu. Tính di động là bằng chứng phát triển lan rộng vào môi trường cách xa đường cấy đâm sâu.

Kiểm tra sự có mặt của nitrit bằng cách dùng pipet chia độ (6.8) và bầu bóp cao su (6.11) lấy từ 0.2 ml đến 0.5 ml thuốc thử phát hiện nitrit (5.6) cho vào từng ống môi trường nitrat để thử tính di động.

CẢNH BÁO – Vì các lý do sức khỏe, phép thử này phải tiến hành trong tủ hút.

Sự hình thành màu đỏ khẳng định sự khử nitrat về nitrit. Nếu màu không hình thành màu đỏ trong 15 phút, thì thêm một lượng nhỏ bụi kẽm (5.7) và để yên 10 phút. Nếu màu đỏ hình thành sau khi thêm bụi kẽm thì đã không xảy ra sự khử nitrat về nitrit.

9.4.3.3 Cấy và đọc trên môi trường lactoza-gelatin

Cấy từng khuẩn lạc đã chọn (xem 9.3) vào môi trường lactoza-gelatin (5.8) vừa mới khử khí. Ủ trong các điều kiện kỵ khí ở 37 °C trong 24 h.

Kiểm tra các ống nghiệm đựng môi trường lactoza-gelatin về việc sinh khí và có xuất hiện màu vàng (do hình thành axit) cho thấy sự lên men lactoza. Làm lạnh các ống 1 h ở 5 °C và kiểm tra sự hòa lỏng gelatin. Nếu môi trường đã đông đặc thì ủ lại thêm 24 h ở 37 °C để kiểm tra sự hòa lỏng gelatin.

9.4.3.4 Giải thích kết quả

Các vi khuẩn sinh ra các khuẩn lạc màu đen trong môi trường SC mà không di động, thường khử nitrat thành nitrit, sinh axit và sinh khí từ lactoza và hoá lỏng geiatin trong vòng 48 h được coi là *C.perfringens*. Các chủng cho phản ứng yếu đối với nitrit (tức là có màu hồng) phải được loại bỏ, vì *C.perfringens* luôn luôn phản ứng mạnh và phản ứng tức thì.

10 Biểu thị kết quả

10.1 Phương pháp tính

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

10.2 Độ chụm

10.2.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các dữ liệu về phương pháp được mô tả trong tiêu chuẩn này dựa trên các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm (xem [2]). Chi tiết về phép thử này được nêu trong Phụ lục A. Các giá trị giới hạn lặp lại và tái lập được xác định sử dụng ba vật liệu chuẩn và ba loại thực phẩm ở các mức độ nhiễm bẩn khác nhau.

Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và các chất nền khác với qui định ở trên.

10.2.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập đơn lẻ (được chuyển về \log_{10}) (số lượng *C.perfringens* trong một gam hoặc trong một mililit) hoặc tỷ số của giá trị cao và giá trị thấp của hai kết quả thử nghiệm trên thang danh định, thu được khi sử dụng cùng phương pháp trên vật liệu thử giống hệt nhau trong cùng một phòng thử nghiệm, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, thực hiện trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại (r).

Như biểu thị chung của giới hạn lặp lại (r), các giá trị sau đây có thể được sử dụng khi kiểm tra các mẫu thực phẩm nói chung. Các giá trị này đối với r là trung bình chung đối với tất cả các chất nền được xem xét trong phép thử liên phòng thử nghiệm:

$r = 0,21$ để khẳng định môi trường LS hoặc $0,25$ để khẳng định MN/LG (được biểu thị theo sự chênh lệch giữa các kết quả thử nghiệm được chuyển thành \log_{10}) hoặc

$r = 1,67$ để khẳng định môi trường LS hoặc $1,8$ để khẳng định MN/LG (được biểu thị theo tỷ số giữa hai giá trị thử nghiệm cao hơn và thấp hơn).

TCVN 4991 : 2005

Đối với các vật liệu chuẩn (xem bảng A.4), các giá trị sau đây có thể được sử dụng:

$r = 0,13$ để khẳng định môi trường LS hoặc $0,12$ để khẳng định MN/LG (được biểu thị theo sự chênh lệch giữa các kết quả thử nghiệm được chuyển thành \log_{10}) hoặc

$r = 1,3$ để khẳng định môi trường LS hoặc để khẳng định MN/LG (được biểu thị theo tỷ số giữa hai kết quả thử nghiệm cao hơn và thấp hơn).

VÍ DỤ: Kết quả thử nghiệm thứ nhất là $10\ 000$ hoặc $1,0 \times 10^4$ *C.perfringens* giả định quan sát được, có trong một gam thực phẩm. Dưới các điều kiện lặp lại, thì tỷ số giữa kết quả thử cao hơn và kết quả thử thấp hơn không được quá 1,9. Nên kết quả thử thứ hai phải nằm trong khoảng từ $5\ 263 (= 10\ 000/1,9)$ đến $19\ 000 (10\ 000 \times 1,9)$ *C.perfringens* giả định trong một gam.

10.2.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ (được chuyển về \log_{10}) (số lượng *C.perfringens* trong một gam hoặc trong một mililit) hoặc tỷ số tuyệt đối của hai kết quả thử nghiệm trên thang danh định, thu được khi sử dụng cùng phương pháp trên vật liệu thử giống hệt nhau trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn tái lập (R).

Như một chỉ thị của giới hạn tái lập (R), các giá trị trong Bảng 1 có thể được sử dụng đối với các loại thực phẩm khác nhau và các vật liệu chuẩn cần thử nghiệm. Các giá trị này là các trung bình của các giá trị thu được trong thử liên phòng thử nghiệm ở các mức khác nhau.¹⁾

Bảng 1 – Các ví dụ về các giá trị R

Loại mẫu	Khẳng định LS		Khẳng định MN và LG	
	R (log) ^a	R^b	R (log) ^a	R^b
Phomat	0,26	1,8	0,31	2,1
Thịt	0,55	3,5	0,52	3,3
Thức ăn chăn nuôi dạng khô	0,65	4,5	0,72	5,3
Vật liệu chuẩn	0,27	1,9	0,29	1,9

a. R (log) là giới hạn tái lập được biểu thị theo sự chênh lệch giữa các kết quả thử nghiệm được chuyển thành \log_{10} .

b. R là giới hạn tái lập được biểu thị theo tỷ số giữa các kết quả thử nghiệm.

VÍ DỤ 1: Kết quả thu được trong phòng thử nghiệm thứ nhất là 10 000 hoặc $1,0 \times 10^4$ *C.perfringens* trong một gam phomat. Dưới các điều kiện tái lập, thì tỷ số giữa kết quả cao hơn và thấp hơn không được quá 2,1. Vì vậy kết quả thử trong phòng thử nghiệm thứ hai phải từ 4 761 (= $10\,000/2,1$) và 21 000 (= $10\,000 \times 2,1$) *C.perfringens* giả định trong một gam.

VÍ DỤ 2: Hơn nữa, phòng thử nghiệm cần biết mức tối đa để có thể vẫn còn phù hợp với giới hạn đã định (ví dụ, giới hạn là 100 000 hoặc $\log_{10}5$). Về điều này, giá trị R (0,31 trên thang log đối với phomat) cần phải nhân với hệ số 0,59. Giá trị 0,18 ($0,31 \times 0,59$) là chênh lệch giữa các kết quả thử nghiệm chuyển sang \log_{10} hoặc 1,52 ($10^{0,18}$) là tỷ số giữa các kết quả thử nghiệm. Do đó, các kết quả đến $\log_{10}5,18$ ($\log_{10}5 + \log_{10}0,18$) hoặc 152 000 ($100\,000 \times 1,52$) không cho thấy sự không phù hợp với giới hạn. Hệ số 0,59 phản ánh thực tế rằng phép thử có khoảng lệch 95 % được dùng để thử nghiệm cho dù giới hạn bị vượt quá. Hệ số 0,59 thu được bằng công thức sau:

$$0,59 = \frac{1,64}{1,96 \times \sqrt{2}}$$

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử nghiệm đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được coi là tùy chọn cùng với các chi tiết của sự cố bất kỳ nào mà có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được, hoặc nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(tham khảo)

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Một phép thử cộng tác quốc tế (xem [2]) gồm 17 phòng thử nghiệm của 15 quốc gia tham gia được thực hiện trên phomat, thịt, thức ăn chăn nuôi và vật liệu chuẩn. Các mẫu thực phẩm/thức ăn chăn nuôi mỗi loại được thử nghiệm ở ba mức nhiễm bẩn *C.perfringens* khác nhau.

Theo ISO 16140, các thông số sau đây được nhận biết trong các phép thử liên phòng thử nghiệm. Phép thử này do viện Y tế Cộng đồng quốc gia (RIVM) tổ chức thực hiện vào tháng 1 năm 2000 và cho các dữ liệu như trong các Bảng A.1 đến A.4.

Bảng A.1 – Các kết quả phân tích dữ liệu thu được với các mẫu phomat

Mẫu	Phomat (mức thấp)	Phomat (mức trung bình)	Phomat (mức cao)
Số lượng phòng thử nghiệm cho các kết quả có hiệu lực	13	13	13
Số lượng mẫu	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	13	13	13
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	0	0	0
Số lượng mẫu được chấp nhận	26	26	26
Giá trị trung bình \bar{x} (\log_{10} cfu/g)	2,5/2,5 ^a	3,5/3,5 ^a	4,5/4,5 ^a
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (\log_{10} cfu/g)	0,11/0,11 ^a	0,06/0,07 ^a	0,08/0,10 ^a
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	4,37/4,59 ^a	1,63/1,97 ^a	1,85/2,31 ^a
Giới hạn lặp lại, r			
- theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} cfu/g)	0,30/0,32 ^a	0,16/0,19 ^a	0,23/0,29 ^a
- theo tỷ số trên thang danh định (cfu/g)	2,0/2,1 ^a	1,5/1,6 ^a	1,7/1,9 ^a
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (\log_{10} cfu/g)	0,13/0,13 ^a	0,08/0,15 ^a	0,11/0,14 ^a
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	5,21/5,11 ^a	2,32/4,38 ^a	2,50/3,11 ^a
Giới hạn tái lập R			
- theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} cfu/g)	0,36/0,35 ^a	0,23/0,43 ^a	0,31/0,39 ^a
- theo tỷ số trên thang danh định (cfu/g)	2,3/2,2 ^a	1,7/2,7 ^a	2,1/2,4 ^a

^a Kết quả thử nhất thu được sử dụng môi trường lactoza-sunfit và kết quả thử hai thu được sử dụng môi trường mra-3 để thử liên di động với môi trường lactoza-gelatin

Bảng A.2 – Các kết quả phân tích dữ liệu thu được với các mẫu thịt xay

Mẫu	Thịt xay (mức thấp)	Thịt xay (mức trung bình)	Thịt xay (mức cao)
Số lượng phòng thử nghiệm cho các kết quả có hiệu lực	13	13	13
Số lượng mẫu	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	13	13	13
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	0	0	0
Số lượng mẫu được chấp nhận	26	26	26
Giá trị trung bình \bar{x} (\log_{10} cfu/g)	2,7/2,7 ^a	3,6/3,6 ^a	4,5/4,5 ^a
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r (\log_{10} cfu/g)	0,06/0,11 ^a	0,06/0,10 ^a	0,11/0,09 ^a
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	2,32/4,22 ^a	1,67/2,70 ^a	2,33/2,01 ^a
Giới hạn lặp lại r			
- theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} cfu/g)	0,18/0,32 ^a	0,17/0,27 ^a	0,29/0,25 ^a
- theo tỷ số trên thang danh định (cfu/g)	1,5/2,1 ^a	1,5/1,9 ^a	2,0/1,8 ^a
Độ lệch chuẩn tái lập S_R (\log_{10} cfu/g)	0,14/0,18 ^a	0,18/0,18 ^a	0,18/0,22 ^a
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	5,01/6,54 ^a	5,07/5,05 ^a	3,90/4,76 ^a
Giới hạn tái lập R			
- theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} cfu/g)	0,38/0,49 ^a	0,51/0,50 ^a	0,49/0,60 ^a
- theo tỷ số trên thang danh định (cfu/g)	2,4/3,1 ^a	3,2/3,2 ^a	3,1/4,0 ^a

^a Kết quả thử nhất thu được sử dụng môi trường lactoza-sunfit và kết quả thứ hai sử dụng môi trường nitrat để thử tính di động với môi trường lactoza-gelatin.

Bảng A.3 – Các kết quả phân tích dữ liệu thu được với các mẫu thức ăn chăn nuôi dạng khô

Mẫu	Thức ăn chăn nuôi (mức thấp)	Thức ăn chăn nuôi (mức trung bình)	Thức ăn chăn nuôi (mức cao)
Số lượng phòng thử nghiệm cho các kết quả có hiệu lực	13	13	13
Số lượng mẫu	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	13	13	13
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	0	0	0
Số lượng mẫu được chấp nhận	25	26	26
Giá trị trung bình \bar{x} (\log_{10} cfu/viên nang)	2,6/2,6 ^a	3,8/3,9 ^a	4,8/4,9 ^a
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r (\log_{10} cfu/viên nang)	0,07/0,10 ^a	0,08/0,08 ^a	0,06/0,04 ^a
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	2,85/3,79 ^a	2,09/1,93 ^a	1,22/0,75 ^a
Giới hạn lặp lại r			
- theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} cfu/viên nang)	0,21/0,28 ^a	0,22/0,21 ^a	0,16/0,10 ^a
- theo tỷ số trên thang danh định (cfu/viên nang)	1,6/1,9 ^a	1,7/1,6 ^a	1,5/1,3 ^a
Độ lệch chuẩn tái lập S_R (\log_{10} cfu/viên nang)	0,32/0,32 ^a	0,25/0,24 ^a	0,17/0,17 ^a
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	12,21/12,03 ^a	6,53/6,18 ^a	3,50/3,49 ^a
Giới hạn tái lập R :			
- theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} cfu/viên nang)	0,88/0,88 ^a	0,69/0,67 ^a	0,47/0,47 ^a
- theo tỷ số trên thang danh định (cfu/viên nang)	7,6/7,6 ^a	4,9/4,7 ^a	3,0/3,0 ^a
^a Kết quả thử nhất thu được sử dụng môi trường lactoza-sunfit và kết quả thử hai sử dụng môi trường nitrat để thử tính di động với môi trường lactoza-gelatin.			

Bảng A.4 – Các kết quả phân tích dữ liệu thu được với các vật liệu chuẩn

Mẫu	Vật liệu chuẩn
Số lượng phòng thử nghiệm cho các kết quả có hiệu lực	13
Số lượng mẫu	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	13
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	0
Số lượng mẫu được chấp nhận	26
Giá trị trung bình \bar{x} (\log_{10} cfu/viên nang)	3,7/3,7 ^a
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r (\log_{10} cfu/viên nang)	0,05/0,05 ^a
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	1,24/1,21 ^a
Giới hạn lặp lại r	
- theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} cfu/viên nang)	0,13/0,12 ^a
- theo thang danh định (cfu/viên nang)	1,3/1,3 ^a
Độ lệch chuẩn tái lập S_R (\log_{10} cfu/viên nang)	0,09/0,09 ^a
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	2,51/2,39 ^a
Giới hạn tái lập R	
- theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} cfu/viên nang)	0,26/0,25 ^a
- theo tỷ số trên thang danh định (cfu/viên nang)	1,8/1,8 ^a
^a Kết quả thử nhất thu được sử dụng môi trường lactoza-sunfit và kết quả thử hai sử dụng môi trường nitrat để thử tính di động với môi trường lactoza-gelatin.	

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] HAUSCHIL and HILSHEIMER, *Appl. Microbiol.* , 27, 1974, pp. 78-82
- [2] SCHULTEN S.M. , BENSCHOP E . , NAGELKERKE N.J.D. and MOOIJMAN K.A. Validation of Microbiological methods: Enumeration of *Clostridium perfringens* according to ISO 7937 (second edition, 1997). Report 286555002, National institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands, 2001
- [3] ISO 16140, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods
-