

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 8128:2015
ISO 11133:2014**

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM, THỨC ĂN CHĂN NUÔI
VÀ NƯỚC - CHUẨN BỊ, SẢN XUẤT, BẢO QUẢN VÀ THỬ
HIỆU NĂNG CỦA MÔI TRƯỜNG NUÔI CÁY**

***Microbiology of food, animal feed and water -- Preparation, production, storage
and performance testing of culture media***

HÀ NỘI - 2015

Mục lục

	Trang
Lời nói đầu	5
Lời giới thiệu	6
1 Phạm vi áp dụng	7
2 Tài liệu viện dẫn	7
3 Thuật ngữ và định nghĩa	8
3.1 Thuật ngữ chung và định nghĩa	9
3.2 Thuật ngữ thử hiệu năng	9
3.3 Thuật ngữ về môi trường nuôi cấy	10
3.4 Thuật ngữ về vi sinh vật thử nghiệm	15
4 Quản lý đảm bảo chất lượng	16
4.1 Hệ thống tài liệu	16
4.2 Bảo quản	17
4.3 Chuẩn bị môi trường trong phòng thử nghiệm	17
4.4 Bảo quản và hạn sử dụng môi trường đã chuẩn bị	21
4.5 Chuẩn bị để sử dụng	22
4.6 Ủ ấm môi trường đặc trong các đĩa Petri	24
4.7 Thải bỏ môi trường	25
5 Vi sinh vật thử nghiệm để thử hiệu năng	25
5.1 Yêu cầu chung	25
5.2 Chọn vi sinh vật thử nghiệm	25
5.3 Bảo quản và duy trì các vi sinh vật thử nghiệm	26
5.4 Vi sinh vật để thử hiệu năng	27
6 Kiểm soát chất lượng và thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy	30
6.1 Yêu cầu chung	30
6.2 Kiểm soát chất lượng lý - hóa	31
6.3 Kiểm soát chất lượng vi sinh vật	31
6.4 Yêu cầu chung đối với phép thử hiệu năng vi sinh vật	32
6.5 Đánh giá hiệu năng và diễn giải các kết quả	34
6.6 Môi trường khẳng định và thuốc thử	34

TCVN 8128:2015

7 Phương pháp thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy đặc	35
7.1 Yêu cầu chung	35
7.2 Phương pháp thử định lượng	35
7.3 Thủ nghiệm môi trường nuôi cấy sử dụng cho lọc màng	38
7.4 Phương pháp thử định tính	38
8 Phương pháp thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy lỏng	39
8.1 Yêu cầu chung	39
8.2 Phương pháp định lượng trong ống nghiệm để thử hiệu năng của môi trường tăng sinh lỏng (phương pháp pha loãng để phân biệt)	39
8.3 Phương pháp định tính trong ống nghiệm để thử hiệu năng của môi trường lỏng chọn lọc	41
8.4 Phương pháp định tính trong ống nghiệm đơn (độ đặc) để thử hiệu năng của môi trường lỏng	42
9 Phương pháp thử hiệu năng của chất pha loãng và môi trường vận chuyển	43
9.1 Yêu cầu chung	43
9.2 Phương pháp thử nghiệm dịch pha loãng	43
9.3 Phương pháp thử môi trường vận chuyển	44
10 Hệ thống tài liệu về các kết quả thử nghiệm	45
10.1 Thông tin từ nhà sản xuất	45
10.2 Truy xuất nguồn gốc	45
Phụ lục A (tham khảo) Tên gọi các thành phần môi trường nuôi cấy sử dụng trong phân tích vi sinh vật thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và nước	46
Phụ lục B (quy định) Chuẩn bị gốc đối chứng và giống làm việc	48
Phụ lục C (quy định) Sơ đồ của các phương pháp thử hiệu năng	50
Phụ lục D (tham khảo) Ví dụ về phiếu ghi các kết quả thử nghiệm môi trường nuôi cấy	54
Phụ lục E (quy định) Các vi sinh vật thử nghiệm và các tiêu chí hiệu năng đối với môi trường nuôi cấy khuẩn lạc được sử dụng cho vi sinh vật trong thực phẩm	55
Phụ lục F (quy định) Các vi sinh vật thử nghiệm và các tiêu chí hiệu năng đối với môi trường nuôi cấy khuẩn lạc được sử dụng cho vi sinh vật trong nước	75
Phụ lục G (quy định) Sử dụng các biểu đồ kiểm chứng để kiểm soát phép thử định lượng môi trường nuôi cấy đặc	87
Phụ lục H (tham khảo) Đảm bảo chất lượng của môi trường nuôi cấy – Xử lý sự cố	96
Phụ lục I (tham khảo) Phép thử định lượng môi trường nuôi cấy lỏng	97
Phụ lục J (quy định) Xác định các phép thử hiệu năng vi sinh vật đối với môi trường nuôi cấy chuẩn hóa	101
Thư mục tài liệu tham khảo	105

Lời nói đầu

TCVN 8128:2015 thay thế TCVN 8128-1:2009 và TCVN 8128-2:2009;

TCVN 8128:2015 hoàn toàn tương đương với ISO 11133:2014;

TCVN 8128:2015 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13
Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn
Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Tại tất cả các phòng thử nghiệm thực hiện kiểm tra vi sinh, các mục tiêu chính là để duy trì, hồi sinh, phát triển, phát hiện và/hoặc định lượng các giống vi sinh vật. Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong tất cả các kỹ thuật nuôi cấy vi sinh vật truyền thống và cũng dùng cho nhiều kỹ thuật thay thế khác. Nhiều công thức môi trường nuôi cấy có bán sẵn trên thị trường và được dùng cho các mục đích tăng trưởng đặc biệt, được mô tả trong các tài liệu.

Nhiều phép thử và nhiều quy trình phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy có thể cho các kết quả hợp lý và tái lập. Các yêu cầu về môi trường nuôi cấy có thể đặc thù đối với mẫu và các sinh vật cần phát hiện. Do đó, môi trường nuôi cấy đáp ứng các tiêu chí quy định là điều kiện tiên quyết đối với mọi công việc về vi sinh. Thủ nghiệm thích đáng phải được thực hiện để chứng minh:

- a) sự chấp nhận của từng mẻ môi trường;
- b) môi trường là "phù hợp cho mục đích"; và
- c) môi trường có thể cho các kết quả phù hợp.

Ba tiêu chí trên là một phần thiết yếu của các quy trình kiểm soát chất lượng nội bộ, với các tài liệu thích hợp, sẽ cho phép giám sát hiệu quả môi trường nuôi cấy và góp phần vào việc cung cấp dữ liệu chính xác và đáng tin cậy. Đối với phép phân tích vi sinh vật đáng tin cậy thì điều cơ bản là sử dụng môi trường nuôi cấy có chất lượng đã được chứng minh. Đối với tất cả các môi trường quy định trong các phương pháp chuẩn, cần xác định các tiêu chí chấp nhận yêu cầu tối thiểu để đảm bảo độ tin cậy của môi trường. Khuyến cáo rằng trong phép xác định các đặc tính hiệu suất của môi trường nuôi cấy cần thực hiện các phép thử theo tiêu chuẩn này.

Việc thiết lập các tiêu chí hiệu suất tối thiểu được chấp nhận rộng rãi đối với môi trường nuôi cấy có thể dẫn đến sản phẩm có chất lượng phù hợp hơn và do đó làm giảm mức độ thử nghiệm cần thiết trong phòng thử nghiệm.

Ngoài ra, các tiêu chí chấp nhận bằng phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này có thể được tất cả các phòng thử nghiệm vi sinh sử dụng để đánh giá tính hiệu quả, chọn lọc và/hoặc đặc tính chọn lọc của môi trường nuôi cấy.

Phân tích vi sinh vật trong thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và nước, các yêu cầu của tiêu chuẩn này phải được ưu tiên trong việc đánh giá chất lượng của môi trường nuôi cấy.

Vi sinh vật trong thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và nước - Chuẩn bị, sản xuất, bảo quản và thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy

Microbiology of food, animal feeding stuffs and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra các định nghĩa liên quan đến việc đảm bảo chất lượng của môi trường nuôi cấy và quy định các yêu cầu đối với việc chuẩn bị các môi trường nuôi cấy dùng để phân tích vi sinh vật trong thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và các mẫu từ các môi trường sản xuất thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi cũng như tất cả các loại nước sinh hoạt hoặc được sử dụng trong chế biến thực phẩm.

Các yêu cầu này có thể áp dụng để chuẩn bị tất cả các loại môi trường nuôi cấy sử dụng trong các phòng thử nghiệm thực hiện phân tích vi sinh vật.

Tiêu chuẩn này cũng đưa ra các tiêu chí và quy định các phương pháp để thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy. Tiêu chuẩn này áp dụng cho các nhà sản xuất như:

- Các tổ chức thương mại sản xuất và/hoặc phân phối môi trường pha chế sẵn để sử dụng, môi trường hoàn chỉnh khô hoặc môi trường bán hoàn chỉnh;
- Các tổ chức phi thương mại cung cấp môi trường cho các bên thứ ba;
- Các phòng thử nghiệm vi sinh tự chuẩn bị môi trường nuôi cấy để sử dụng.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 8128:2015

TCVN 6404 (ISO 7218), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật.*

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

TCVN 6507-2 (ISO 6887-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – 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, 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 thuỷ sản và sản phẩm thuỷ sản.*

TCVN 6507-4 (ISO 6887-4), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – 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 thuỷ sản và sản phẩm thuỷ sản.*

TCVN 6507-5 (ISO 6887-5), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 5: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị mẫu sữa và sản phẩm sữa.*

TCVN 6507-6 (ISO 6887-6), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 6: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị mẫu được lấy từ giai đoạn sản xuất ban đầu.*

TCVN 9716 (ISO 8199), *Chất lượng nước – Hướng dẫn chung về đếm vi sinh vật bằng nuôi cấy.*

ISO 7704, *Water quality – Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses (Chất lượng nước – Đánh giá bộ lọc màng được sử dụng trong phân tích vi sinh).*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

CHÚ THÍCH 1: Điều này cung cấp các định nghĩa chung liên quan đến đảm bảo chất lượng của môi trường nuôi cấy và cung cấp các thuật ngữ liên quan đến thực hiện thử nghiệm, môi trường nuôi cấy và vi sinh vật thử nghiệm.

CHÚ THÍCH 2 Các Bảng E.2 và F.2 đưa ra các giải thích về các thuật ngữ viết tắt tên gọi môi trường.

3.1 Thuật ngữ chung và định nghĩa

3.1.1

Kiểm soát chất lượng (quality control)

Một phần của quản lý chất lượng tập trung vào thực hiện các yêu cầu chất lượng.

CHÚ THÍCH 1: Xem Tài liệu tham khảo [1].

3.1.2

Mè môi trường nuôi cấy (batch of culture medium)

Lô môi trường nuôi cấy (lot of culture medium)

Đơn vị môi trường đồng nhất và hoàn toàn có thể truy xuất liên quan đến một lượng xác định của nguyên liệu, bán thành phẩm hoặc thành phẩm, đồng nhất về kiểu loại và chất lượng và được sản xuất trong một giai đoạn xác định, có cùng số mẻ (hoặc số lô) sản xuất.

3.1.3

Cơ chất tạo màu (chromogenic substrate)

Cơ chất phát huỳnh quang (fluorogenic substrate)

Cơ chất có chứa một nhóm chất màu/nhóm chất huỳnh quang và cơ chất để nuôi cấy được bồi vi khuẩn hoặc nấm.

CHÚ THÍCH 1: Sau khi tách cơ chất tạo màu/cơ chất phát huỳnh quang, chất màu/huỳnh quang được giải phóng và sản phẩm cuối cùng có màu/huỳnh quang có thể nhìn thấy được/có thể được phát hiện bằng cách sử dụng đèn cực tím (UV).

3.2 Thuật ngữ thử hiệu năng

3.2.1

Hiệu năng môi trường nuôi cấy (performance of culture media)

Sự đáp ứng của môi trường nuôi cấy đối với các vi sinh vật thử nghiệm trong các điều kiện xác định.

3.2.2

Vi sinh vật đích (target microorganism)

Vi sinh vật hoặc nhóm vi sinh vật cần được phát hiện hoặc định lượng.

3.2.3

Vi sinh vật không phải đích (non-target microorganism)

Vi sinh vật bị ức chế bởi môi trường và/hoặc điều kiện ủ hoặc không hiển thị các đặc trưng mong muốn của các vi sinh vật đích.

3.2.4

Hiệu suất của môi trường nuôi cấy (productivity of culture medium)

Mức thu hồi vi sinh vật đích từ môi trường nuôi cấy trong các điều kiện xác định.

3.2.5

Tính chọn lọc của môi trường nuôi cấy (selectivity of culture medium)

Mức độ ức chế các vi sinh vật không phải đích trên hoặc trong một môi trường nuôi cấy chọn lọc trong các điều kiện quy định.

3.2.6

Tính đặc thù của môi trường nuôi cấy (electivity of culture medium)

Tính đặc hiệu của môi trường nuôi cấy (specificity of culture medium)

Trong các điều kiện xác định, các vi sinh vật không phải đích không hiển thị các đặc tính tương tự như vi sinh vật đích.

3.3 Thuật ngữ về môi trường nuôi cấy

3.3.1

Môi trường nuôi cấy (culture medium)

Sự tạo thành của các chất ở dạng lỏng, bán đặc hoặc dạng đặc, có chứa các thành phần tự nhiên và/hoặc tổng hợp để giúp cho việc nhân lên (có hoặc không có sự ức chế một số vi sinh vật nhất định), nhận biết hoặc duy trì sự sống của các vi sinh vật.

CHÚ THÍCH Khi được sử dụng cùng với các cụm từ khác thì thuật ngữ này thường gọi tắt là "môi trường" (ví dụ: môi trường tăng sinh).

3.3.2 Môi trường nuôi cấy phân loại theo thành phần

3.3.2.1

Môi trường xác định về hóa học (chemically defined medium)

Môi trường nuôi cấy chỉ bao gồm các thành phần hóa học xác định đã biết về cấu trúc phân tử và độ tinh khiết.

3.3.2.2

Môi trường không xác định hoặc môi trường không xác định một phần về hóa học (chemically undefined or partially undefined medium)

Môi trường nuôi cấy bao gồm toàn bộ hoặc một phần của nguyên liệu tự nhiên, đã chế biến hoặc cách khác, có thành phần hóa học chưa được xác định hoàn toàn.

CHÚ THÍCH 1: Các tên gọi đối với các thành phần không xác định về mặt hóa học được sử dụng trong môi trường nuôi cấy được quy định trong Phụ lục A.

3.3.2.3

Môi trường nuôi cấy sinh màu (chromogenic culture medium)

Môi trường nuôi cấy phát huỳnh quang (fluorogenic culture medium)

Môi trường nuôi cấy có chứa một hoặc nhiều cơ chất tạo màu/cơ chất phát huỳnh quang.

CHÚ THÍCH 1: Môi trường nuôi cấy sinh màu tạo thuận tiện cho việc nhận biết các vi khuẩn hoặc nấm bởi màu sắc xác định hoặc các đặc điểm hình thái (môi trường nuôi cấy phát triển diễn hình). Môi trường nuôi cấy phát huỳnh quang yêu cầu quan sát dưới đèn UV. Các sản phẩm phản ứng sinh hóa cần thiết cho việc đánh giá môi trường nuôi cấy sinh màu/phát huỳnh quang, thường là kết quả hoạt động enzym của các sinh vật nhất định, phụ thuộc rất nhiều vào việc duy trì chính xác các điều kiện cụ thể (ví dụ như nhiệt độ, độ pH, nồng độ cơ chất).

3.3.3 Môi trường nuôi cấy được phân loại theo trạng thái vật lý

3.3.3.1

Môi trường lỏng (liquid medium)

Môi trường nuôi cấy bao gồm dung dịch hòa tan của một hoặc nhiều thành phần, như nước pepton và canh thang dinh dưỡng.

CHÚ THÍCH 1: Trong một số trường hợp, các hạt rắn được cho vào môi trường nuôi cấy lỏng, như nước thịt.

CHÚ THÍCH 2 : Môi trường dạng lỏng đựng trong các ống, bình hoặc chai thường được gọi là "canh thang".

3.3.3.2

Môi trường đặc (solid medium)

Môi trường bán đặc (semi-solid medium)

Môi trường lỏng chứa các chất làm đông đặc (ví dụ: thạch, gelatin) ở các nồng độ khác nhau.

CHÚ THÍCH 1 : Do môi trường agar-agar đông đặc được sử dụng rộng rãi, nên thuật ngữ rút ngắn "agar" ("thạch") thường được sử dụng đồng nghĩa với môi trường đặc và liên quan đến "thạch đầm đĩa".

CHÚ THÍCH 2 : Môi trường đặc được rót vào các đĩa Petri thường được gọi là "thạch đầm đĩa". Môi trường đặc được rót vào các ống hoặc chai nhỏ được giữ theo vị trí nghiêng để cho môi trường đông đặc lại được gọi là "thạch nghiêng" hoặc "đốc". Nếu môi trường được phân phổi vào đáy vật chứa, tạo thành "thạch đứng".

3.3.4 Môi trường nuôi cấy được phân loại theo mục đích sử dụng

3.3.4.1

Môi trường vận chuyển (transport medium)

Môi trường được thiết kế để bảo tồn và duy trì khả năng sống của vi sinh vật trong khi vẫn giảm thiểu thời gian tính từ lúc thu thập mẫu đến khi xử lý mẫu trong phòng thử nghiệm.

Ví dụ: Môi trường vận chuyển Stuart hoặc Amies.

3.3.4.2

Môi trường bảo quản (preservation medium)

Môi trường được thiết kế để bảo tồn và duy trì sự tồn tại của các vi sinh vật trong một thời gian dài, nhằm bảo vệ các vi sinh vật chống lại những ảnh hưởng bất lợi có thể xảy ra trong thời gian bảo quản dài và cho phép phục hồi sau giai đoạn bảo quản.

Ví dụ: Môi trường trứng Dorset, thạch dinh dưỡng nghiêng.

3.3.4.3

Môi trường pha loãng (diluent medium)

Môi trường huyền phù (suspension medium)

Môi trường được thiết kế để tách các vi sinh vật từ sản phẩm thử nghiệm dạng đặc thành dạng lỏng và/hoặc làm giảm nồng độ bằng cách pha loãng mà không làm tăng hoặc làm ức chế vi sinh vật trong thời gian tiếp xúc.

Ví dụ: Dung dịch muối pepton.

3.3.4.4

Môi trường phục hồi (resuscitation medium)

Môi trường tạo điều kiện cho các vi sinh vật bị ức chế và bị hư hỏng có thể phục hồi và phát triển bình thường mà không cần thiết phải nhân lên.

Ví dụ: Nước đậm pepton.

CHÚ THÍCH 1: Môi trường phục hồi cũng có thể được sử dụng làm môi trường tăng sinh sơ bộ, ví dụ: nước đậm pepton.

3.3.4.5

Môi trường tăng sinh sơ bộ (pre-enrichment medium)

Môi trường tăng sinh (enrichment medium)

Môi trường dạng lỏng, có thành phần tạo điều kiện thuận lợi cho việc nhân lên các vi sinh vật.

Ví dụ: Canh thang trypton đậu tương.

3.3.4.5.1

Môi trường tăng sinh chọn lọc (selective enrichment medium)

Môi trường tăng sinh cho phép một số vi sinh vật nhân lên trong khi lại ức chế một phần hoặc hoàn toàn sự tăng trưởng của các vi sinh vật khác.

Ví dụ: Môi trường Rappaport-Vassiliadis pepton đậu tương (RVS).

3.3.4.5.2

Môi trường tăng sinh không chọn lọc (non-selective enrichment medium)

Môi trường tăng sinh cho phép nhiều loại vi sinh vật phát triển.

Ví dụ: Canh thang tim não.

3.3.4.6

Môi trường phân lập (isolation medium)

Môi trường đặc hoặc bán đặc cho phép các vi sinh vật phát triển.

3.3.4.6.1

Môi trường phân lập chọn lọc (selective isolation medium)

Môi trường phân lập cho phép phát triển các vi sinh vật đích cụ thể, trong khi lại ức chế hoàn toàn hoặc một phần các vi sinh vật khác.

Ví dụ: Thạch deoxycholat cefoperazon than cài biển (Thạch mCCD).

3.3.4.6.2

Môi trường phân lập không chọn lọc (non-selective isolation medium)

Môi trường phân lập không ức chế chọn lọc các vi sinh vật.

Ví dụ: Thạch dinh dưỡng.

3.3.4.6.3

Môi trường nuôi cấy chọn lọc sinh màu (chromogenic selective culture medium)

Môi trường nuôi cấy chọn lọc phát huỳnh quang (fluorogenic selective culture medium)

Môi trường nuôi cấy sinh màu/phát huỳnh quang cũng chứa các chất chọn lọc để ức chế hoàn toàn hoặc một phần đi kèm với hệ vi sinh vật có trong mẫu thử, do đó hỗ trợ cho việc phát hiện chính xác các vi sinh vật đích.

Ví dụ: Thạch TBX, môi trường MUG/EC.

3.3.4.7

Môi trường phân biệt (differential medium)

Môi trường đặc trưng (characterization medium)

Môi trường cho phép thử nghiệm một hoặc nhiều đặc tính sinh lý/sinh hóa của các vi sinh vật để nhận biết chúng.

Ví dụ: Thạch TBX, thạch Lactose với *taqilol* Z và TTC.

CHÚ THÍCH 1 : Các môi trường phân biệt có thể được sử dụng như môi trường phân lập được gọi là môi trường phân lập/phân biệt, ví dụ như thạch deoxycholat lysin xylose (XLD), thạch TTC lactose.

3.3.4.8

Môi trường nhận biết (identification medium)

Môi trường được thiết kế để tạo ra phản ứng nhận biết cụ thể mà thường không yêu cầu thêm bất kỳ phép thử khẳng định nào.

Ví dụ: Thạch mật azid aesculin.

3.3.4.9

Môi trường định lượng (enumeration medium)

Môi trường nuôi cấy chọn lọc hoặc không chọn lọc, cho phép định lượng các vi sinh vật.

Ví dụ: Thạch Baird-Parker, chất chiết nấm men.

CHÚ THÍCH 1: Môi trường định lượng có thể bao gồm các thuộc tính của môi trường tăng sinh và/hoặc phục hồi.

3.3.4.10

Môi trường khẳng định (confirmation medium)

Môi trường góp phần vào việc nhận biết hoặc xác định đặc trưng của vi sinh vật sau khi phục hồi sơ bộ và/hoặc tăng sinh và/hoặc phân lập.

Ví dụ: Thạch sắt Kligler.

3.3.4.11

Môi trường có chứa các chất trung hòa (medium containing neutralisers)

Môi trường vận chuyển, môi trường pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy có chứa các chất trung hòa để làm bất hoạt chất tẩy rửa/ chất khử trùng hoặc các chất diệt sinh vật khác.

3.3.4.12

Môi trường sử dụng cho nhiều mục đích (medium having multiple uses)

Môi trường được phân vào một số mục khác nhau.

Ví dụ: Thạch máu là môi trường phục hồi theo 3.3.4.4, môi trường phân lập theo 3.4.4.6 và môi trường phân biệt theo 3.3.4.7 sử dụng để phát hiện tan máu. Nước đậm pepton là chất pha loãng theo 3.3.4.3 và môi trường tăng sinh sơ bộ theo 3.3.4.5.

3.3.4.13

Môi trường đối chứng (reference medium)

Môi trường, thường là không chọn lọc, để đánh giá so sánh về hiệu suất độc lập của môi trường cần thử nghiệm và được chứng minh là phù hợp cho việc sử dụng để kiểm soát.

Ví dụ: Thạch trypton đậu tương (TSA).

3.3.5 Môi trường nuôi cấy được phân loại theo phương pháp chuẩn bị

3.3.5.1

Môi trường để sử dụng ngay (ready-to-use medium)

Môi trường lỏng, đặc hoặc bán đặc được cung cấp trong các đĩa, chai lọ, ống nghiệm hoặc vật chứa khác, ở dạng để sử dụng ngay hoặc để sử dụng sau khi làm tan chảy hoặc để sử dụng ngay sau khi làm tan chảy và bổ sung.

3.3.5.1.1

Môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh (finished culture medium)

Môi trường ở sẵn sàng để nuôi cấy.

3.3.5.1.2

Môi trường sử dụng ngay sau khi làm tan chảy lại (ready-to-use medium after remelting)

Môi trường cần làm tan chảy lại, ví dụ để sử dụng trong kỹ thuật đỗ đĩa hoặc để rót vào các đĩa Petri.

3.3.5.1.3

Môi trường sử dụng ngay sau khi làm tan chảy lại và bổ sung (ready-to-use medium after remelting and supplementing)

Môi trường cần làm tan chảy lại, bổ sung và phân phối trước khi sử dụng (trước đó môi trường chưa sẵn sàng để sử dụng).

Ví dụ: Thạch sulfit xycloserin tryptose (TSC), thạch Baird-Parker hoặc thạch Fibrinogen huyết tương thỏ (RPF).

3.3.5.2

Môi trường được chuẩn bị từ các chế phẩm khô bán sẵn (medium prepared from commercially dehydrated formulations)

Môi trường ở dạng khô yêu cầu bù nước và xử lý trước khi sử dụng, ở một trong hai dạng sau:

- môi trường hoàn chỉnh;
- môi trường không hoàn chỉnh cần bổ sung trước khi sử dụng.

Ví dụ: Dạng bột, dạng hạt, sản phẩm đóng khô.

3.3.5.3

Môi trường được chuẩn bị từ các thành phần riêng lẻ (medium prepared from individual component)

Môi trường được sản xuất bởi một phòng thử nghiệm vi sinh hoàn toàn từ các thành phần riêng lẻ.

3.4 Thuật ngữ về vi sinh vật thử nghiệm

3.4.1

Sinh vật thử nghiệm (test organism)

Vi sinh vật thường được sử dụng để thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy.

CHÚ THÍCH 1: Sinh vật thử nghiệm được xác định tiếp theo nguồn của chúng (xem 3.4.2 đến 3.4.7).

3.4.2

Chủng đối chứng (reference strain)

Vi sinh vật thu được trực tiếp từ một bộ sưu tập chủng đối chứng, từ bộ sưu tập chủng của Liên đoàn thế giới các Bảo tàng giống vi sinh vật (WFCC) hoặc Tổ chức Bảo tàng giống vi sinh vật châu Âu (ECCO) và được xác định ít nhất đến mức chi và loài, được phân loại và mô tả theo đặc điểm của chúng và tốt nhất là có nguồn gốc từ thực phẩm, thức ăn chăn nuôi hoặc môi trường sản xuất thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi hoặc nước.

3.4.3

Gốc đối chứng (reference stock)

Các giống riêng biệt giống hệt nhau thu được bằng cây chuyền riêng rẽ từ chủng đối chứng trong phòng thử nghiệm hoặc có được từ một nhà cung cấp.

3.4.4

Giống gốc (stock culture)

Cây chuyền từ gốc đối chứng.

3.4.5

Giống làm việc (working culture)

Cây chuyền từ gốc đối chứng hoặc giống gốc hoặc chất đối chứng, đã được chứng nhận hoặc không.

3.4.6

Chất chuẩn (reference material)

RM

Vật liệu có chứa một lượng vi sinh vật có thể sống lại, đồng nhất và ổn định đối với số lượng vi sinh vật sống, đã được thiết lập là để phù hợp với mục đích sử dụng trong quá trình định lượng.

CHÚ THÍCH 1 : Xem Tài liệu tham khảo [3].

3.4.7

Chất chuẩn đã được chứng nhận (certified reference material)

CRM

Chất chuẩn được định rõ đặc điểm bằng quy trình có hiệu lực về đo lường để định lượng các vi sinh vật sống, đi kèm giấy chứng nhận ghi rõ số lượng quy định của các vi sinh vật sống, với độ không đảm bảo đo và liên kết chuẩn đo lường.

CHÚ THÍCH 1: Xem Tài liệu tham khảo [3].

4 Quản lý đảm bảo chất lượng

4.1 Hệ thống tài liệu

4.1.1 Tài liệu từ nhà sản xuất hoặc người sản xuất

Nhà sản xuất (các tổ chức thương mại hoặc phi thương mại cung cấp môi trường cho bên thứ ba) cần có sẵn các tài liệu sau đây:

- tên môi trường, các thành phần riêng lẻ và các thành phần bổ sung bất kỳ, nếu có và các mã số sản phẩm;
- bảng dữ liệu kỹ thuật, ví dụ: công thức, mục đích sử dụng, lượng đổ đầy, nếu có;
- dữ liệu an toàn và/hoặc mối nguy khi cần.
- số mě;
- pH đích của môi trường hoàn chỉnh;
- thông tin bảo quản và hạn sử dụng;
- hạn sử dụng dự định;
- giấy chứng nhận kiểm soát chất lượng, các vi sinh vật thử nghiệm được sử dụng và các kết quả phép thử hiệu năng theo các tiêu chí chấp nhận.

4.1.2 Chấp nhận giao sản phẩm

Đối với mỗi mě sản phẩm (thành phần hoặc môi trường nuôi cấy), kiểm tra như sau:

- nhận biết sản phẩm;
- tính nguyên vẹn của bao gói;
- hạn dùng của sản phẩm;
- tài liệu được cung cấp.
- số lượng đơn vị nhận được

Ghi lại ngày nhận sản phẩm.

4.2 Bảo quản

4.2.1 Yêu cầu chung

Trong mọi trường hợp, phải tuân thủ các hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2 Quản lý chất lượng và kiểm soát sản phẩm môi trường khô và các thành phần bổ sung

Môi trường dạng bột khô hoặc dạng hạt đựng trong vật chứa có nắp đậy kín. Các chất bổ sung chọn lọc khác nhau hoặc các chất chẩn đoán được cung cấp ở trạng thái lỏng, bột hoặc đông khô. Việc đặt mua môi trường cần lập kế hoạch quay vòng định kỳ trong kho (nghĩa là vào trước-ra trước). Khi mở vật chứa mới cần:

- kiểm tra niêm phong;
- ghi ngày mở lần đầu tiên;
- nhìn để đánh giá lượng chứa trong hộp đã mở.

Sau khi mở hộp chứa mới, chất lượng của môi trường có thể phụ thuộc vào điều kiện bảo quản. Chất lượng môi trường khô bị giảm khi thấy có sự thay đổi đặc tính chảy của bột, tính đồng nhất, vón cục, đổi màu v.v... Môi trường khô đã hút ẩm hoặc thay đổi nhiều về hình thức bên ngoài thì phải loại bỏ.

Khi mở chai đựng môi trường khô, ghi lại ngày tháng và nêu rõ thời gian bảo quản tối đa.

4.3 Chuẩn bị môi trường trong phòng thử nghiệm

4.3.1 Yêu cầu chung

Chuẩn bị chính xác môi trường nuôi cấy là một trong các bước cơ bản để đảm bảo tính toàn diện trong kiểm tra vi sinh vật và được chú ý đặc biệt.

Chú ý về thực hành tốt phòng thử nghiệm và các hướng dẫn của nhà sản xuất liên quan đến xử lý môi trường khô và các thành phần khác, đặc biệt các thành phần có chứa các vật liệu độc hại, nghĩa là muối mặn, natri azid, chất kháng sinh hoặc các chất chọn lọc khác.

Khi môi trường được chuẩn bị từ các chế phẩm khô có bán sẵn, thì tuân thủ chính xác các hướng dẫn của nhà sản xuất. Ghi lại tất cả các dữ liệu liên quan, như khối lượng/thể tích, mã sản phẩm, số hiệu lô hàng, pH, ngày chuẩn bị, điều kiện khử trùng, người thực hiện.

Đối với môi trường được chuẩn bị từ các thành phần riêng lẻ, thực hiện chính xác theo công thức. Ghi lại tất cả mọi chi tiết và nhận biết đầy đủ (nghĩa là mã sản phẩm, số hiệu lô hàng và hạn sử dụng, nếu có sẵn) của tất cả các thành phần được sử dụng.

Phụ lục D nêu ví dụ về thông tin này.

4.3.2 Chất lượng của các thành phần môi trường cơ bản

Công thức của các thành phần môi trường cơ bản được quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể (xem Thư mục tài liệu tham khảo). Khi sẵn có, nêu rõ khối lượng phân tử và số CAS¹⁾ của hóa chất trong công thức.

Trong một số trường hợp, thành phần cụ thể (ví dụ nêu dưới đây) được quy định trong công thức cần được điều chỉnh để có được môi trường ổn định và phù hợp.

- pepton và nước thịt hoặc chất chiết nấm men có thể thay đổi các đặc tính dinh dưỡng của chúng;
- thạch có thể thay đổi sức đồng;
- các chất đệm;
- muối mật, chất chiết mật và deoxycolat, chất màu kháng khuẩn, phụ thuộc vào các đặc tính chọn lọc của chúng;
- chất chỉ thị màu;
- các chất kháng sinh, phụ thuộc vào hoạt tính và tương tác với các thành phần khác.

CHÚ THÍCH: Ở quy mô công nghiệp, các nhà sản xuất thường đưa ra công thức đã được tối ưu hóa để đáp ứng các tiêu chí thực hiện. Thông thường trước tiên là chọn các thành phần, sau đó điều chỉnh nồng độ giữa các sản phẩm để thu được cùng hiệu năng và giảm thiểu biến động giữa các mẻ.

4.3.3 Nước

Để chuẩn bị môi trường nuôi cấy, chỉ sử dụng nước tinh khiết như nước cất, đã khử khoáng, đã loại ion hoặc được sản xuất bằng thẩm thấu ngược hoặc nước có chất lượng tương đương không chứa các chất gây ức chế hoặc ảnh hưởng đến sự phát triển của vi sinh vật trong các điều kiện thử nghiệm, ví dụ: các vết clo, vết amoniac và các vết ion kim loại.

¹⁾ Số CAS là đơn vị nhận dạng đơn nhất của Tổ chức Chemical Abstracts Service (CAS) đối với các nguyên tố, các hợp chất hóa học, polyme, các trình tự sinh học, các hỗn hợp và các hợp kim.

Nước tinh khiết phải được bảo quản trong vật chứa có nắp đậy kín làm bằng vật liệu trơ (thủy tinh trung tính, polyetylen v.v...) không chứa các chất gây ức chế. Tuy nhiên, sử dụng nước mới được chứng cắt.

Số lượng vi khuẩn không được vượt quá 10^3 đơn vị hình thành khuẩn lạc (cfu)/ml và tốt nhất là dưới 10^2 cfu/ml. Sự nhiễm khuẩn cần được kiểm soát định kỳ theo ISO 6222^[4], ủ ám ở $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ trong $68\text{ h} \pm 4\text{ h}$ hoặc sử dụng phương pháp tương đương.

CHÚ THÍCH Nước đã loại ion (đã khử khoáng) có thể chứa lượng vi sinh vật rất cao, do đó, chỉ sử dụng loại nước này khi kiểm tra hàm lượng vi sinh vật. Tham khảo tư vấn của nhà sản xuất để tìm biện pháp tốt nhất nhằm giảm thiểu nhiễm khuẩn. Nước đã khử khoáng bị nhiễm bẩn cao, thậm chí đã khử trùng bằng cách lọc, thì vẫn có thể còn chứa các chất mà có thể gây ức chế sự phát triển của các vi sinh vật nhất định.

Độ dẫn điện của nước được sử dụng trong phòng thử nghiệm không được lớn hơn $25\text{ }\mu\text{s.cm}^{-1}$ (tương đương với điện trở $\geq 0,04\text{ M}\Omega.\text{cm}$) và tốt nhất là dưới $5\text{ }\mu\text{s.cm}^{-1}$ [nước đạt chất lượng loại 3 quy định trong TCVN 4851 (ISO 3696)^[5]] ở 25°C , trừ khi có quy định khác. Độ dẫn điện của nước cần được kiểm tra trước khi sử dụng.

4.3.4 Cân và hoàn nước

Tuân thủ các cảnh báo về an toàn, cân cẩn thận một lượng cần thiết của môi trường khô hoặc các thành phần riêng lẻ và khuấy trộn với một lượng nước cần thiết để tránh vón cục. Dùng cân chính xác có sai số tối đa cho phép nhỏ hơn hoặc bằng 1 % như trong TCVN 6404 (ISO 7218) và TCVN 9716 (ISO 8199). Các thành phần phải được cho vào một lượng nước quy định, trừ khi có quy định khác.

4.3.5 Hoà tan và phân tán

Môi trường khô cần được phân tán nhanh bằng cách khuấy ngay và khuấy liên tục sau đó đun nóng để hòa tan, nếu cần. Môi trường chứa thạch cần được ngâm trong nước vài phút trước khi làm nóng, khuấy để hòa tan và sau đó phân phối vào vật chứa, nếu cần, trước khi hấp áp lực. Tránh để môi trường bị quá nhiệt.

4.3.6 Đo và chỉnh pH

Dùng máy đo pH để đo độ pH và chỉnh trước khi khử trùng, nếu cần, sao cho sau khi khử trùng và làm nguội đến 25°C , môi trường có pH đạt yêu cầu $\pm 0,2$ đơn vị pH, trừ khi có quy định khác. Thông thường sử dụng dung dịch natri hydroxit khoảng 40 g/l [$c(\text{NaOH}) = 1\text{ mol/l}$] hoặc axit clohydric loãng khoảng $36,5\text{ g/l}$ [$c(\text{HCl}) = 1\text{ mol/l}$] để điều chỉnh pH. Việc điều chỉnh này được thực hiện sau khi khử trùng, sử dụng dung dịch đã khử trùng. Việc chỉnh pH được nêu trong TCVN 6404 (ISO 7218) và TCVN 9716 (ISO 8199).

CHÚ THÍCH Môi trường có bán sẵn thường cho thấy thay đổi pH trước và sau khi hấp áp lực khác nhau đáng kể. Tuy nhiên, nếu sử dụng nước cất hoặc nước đã khử khoáng, thì việc chỉnh pH trước khi hấp áp lực là không cần thiết.

4.3.7 Phân phối

Phân phối môi trường vào các vật chứa thích hợp, đảm bảo có khoảng trống phía trên để tránh quá sôi trong quá trình làm nguội sau khi xử lý nhiệt bằng hấp áp lực hoặc làm chảy lại hoặc làm tràn sau khi thêm các thành phần khác.

CHÚ THÍCH: Khoảng trống này có thể không cần thiết nếu áp lực trong nồi hấp được duy trì trong suốt quá trình làm nguội.

4.3.8 Khử trùng

4.3.8.1 Yêu cầu chung

Khử trùng môi trường nuôi cấy đã chuẩn bị trong ngày sử dụng.

Khử trùng môi trường nuôi cấy và thuốc thử bằng khử trùng ướt bằng nhiệt (4.3.7.2) hoặc bằng cách lọc (4.3.7.3).

Một số môi trường nhất định không cần hấp áp lực nhưng có thể được sử dụng sau khi đun sôi. Ví dụ: môi trường *Enterobacteriaceae* chứa xanh brilliant thường đặc biệt nhạy với nhiệt và ánh sáng và cần được làm nguội nhanh sau khi đun sôi và bảo vệ tránh ánh sáng mạnh. Cũng tương tự, một số thuốc thử có thể được sử dụng mà không cần phải khử trùng. Trong mọi trường hợp, xem tiêu chuẩn thích hợp cụ thể hoặc hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3.8.2 Khử trùng bằng nhiệt ẩm

Việc khử trùng bằng nhiệt ẩm được thực hiện trong nồi hấp áp lực hoặc máy chuẩn bị môi trường.

Đối với các vật chứa môi trường với thể tích lớn hơn 1 000 ml, chấp nhận chu kỳ khử trùng của nồi hấp áp lực để đảm bảo xử lý nhiệt đầy đủ. Trong mọi trường hợp, tuân thủ các hướng dẫn nêu trong tiêu chuẩn cụ thể hoặc theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

CHÚ THÍCH Việc quá nhiệt cục bộ có thể xuất hiện khi hấp áp lực môi trường với thể tích lớn ($> 1\,000\text{ ml}$).

Sau khi gia nhiệt cần làm nguội môi trường tránh để trào. Điều này đặc biệt quan trọng đối với môi trường có thể tích lớn và đối với các môi trường có các thành phần nhạy cảm với nhiệt, ví dụ: môi trường chứa lục sáng.

Thông tin bổ sung về khử trùng bằng nhiệt ẩm được nêu trong TCVN 6404 (ISO 7218) [11].

Việc khử trùng bằng nhiệt cần được đánh giá sử dụng các giá trị F_0 , có tính đến việc xử lý nhiệt trong suốt quá trình gia nhiệt và làm nguội. Việc xử lý nhiệt cần được xác định cho từng mẻ cụ thể, để đảm bảo xử lý thích hợp các vật chứa ở bất kỳ vị trí nào trong nồi hấp áp lực.

4.3.8.3 Khử trùng bằng cách lọc

Khử trùng bằng cách lọc có thể được thực hiện trong các điều kiện chân không hoặc giảm áp suất. Sử dụng thiết bị và các màng lọc vô trùng có cỡ lỗ $0,2 \mu\text{m}$. Khử trùng các bộ phận khác nhau của thiết bị lọc theo TCVN 6404 (ISO 7218) hoặc TCVN 9716 (ISO 8199) hoặc sử dụng dụng cụ đã khử trùng trước.

Một số màng lọc có thể giữ lại các protein hoặc các chất khác (như kháng sinh). Để thu được nồng độ đúng, người sử dụng cần chọn kiểu màng lọc thích hợp, ví dụ: màng liên kết protein thấp và bộ lọc đã được làm trót sơ bộ.

4.3.8.4 Chuẩn bị các chất bổ sung

CẢNH BÁO – Các chất bổ sung có chứa các chất độc, đặc biệt là các chất kháng sinh, cần được xử lý cẩn thận để tránh phân tán vào bột có thể gây dị ứng hoặc các phản ứng cho nhân viên phòng thử nghiệm. Thực hiện các biện pháp phòng ngừa thích hợp và tuân thủ các hướng dẫn của nhà sản xuất khi pha chế các dung dịch.

Không sử dụng các chất bổ sung được pha chế đã hết hạn sử dụng, đối với các dung dịch làm việc của các chất kháng sinh chỉ sử dụng trong ngày chuẩn bị. Trong những tình huống nhất định, các dung dịch kháng sinh có thể được bảo quản đông lạnh với các lượng thích hợp nhưng không cấp đông lại sau khi rã đông. Khả năng giảm hoạt tính do đông lạnh cần được nhà sản xuất thiết lập hoặc được người sử dụng kiểm tra.

4.4 Bảo quản và hạn sử dụng môi trường đã chuẩn bị

4.4.1 Môi trường sử dụng có bán sẵn trên thị trường

Tuân thủ các hướng dẫn của nhà sản xuất về các điều kiện bảo quản, hạn sử dụng và cách sử dụng.

4.4.2 Môi trường được chuẩn bị trong phòng thử nghiệm

4.4.2.1 Yêu cầu chung

Nhận biết tất cả các môi trường để đảm bảo truy xuất được nguồn gốc.

Các môi trường có thời hạn sử dụng là khác nhau. Trong các tiêu chuẩn riêng sẽ quy định các điều kiện cụ thể và thời hạn sử dụng của từng loại môi trường nhưng phòng thử nghiệm phải thẩm định các điều kiện đó. Phòng thử nghiệm phải quy định tần suất kiểm tra xác nhận.

Bảo quản môi trường ở các điều kiện không làm thay đổi thành phần môi trường, tránh ánh sáng và tránh bị khô. Bảo quản ở $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, nếu không sử dụng ngay hoặc theo quy định khác trong tiêu chuẩn cụ thể.

Nếu được bảo quản lạnh, thì không nên bảo quản quá 2 tuần đến 4 tuần đối với đĩa và đối với các ống hoặc lọ nhỏ thì không quá 3 tháng đến 6 tháng, trừ khi có quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể hoặc các kết quả kiểm tra xác nhận thời hạn sử dụng của phòng thử nghiệm cho thấy lâu hơn. Thông tin bổ sung về thời hạn bảo quản tối đa đối với môi trường pha chế sẵn được nêu trong TCVN 9716 (ISO 8199), Tài liệu tham khảo [17] và [21].

Khuyên cáo, môi trường được bổ sung các thành phần không ổn định thì cần được sử dụng trong ngày, trừ khi có quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể hoặc các kết quả kiểm tra xác nhận thời hạn sử dụng của phòng thử nghiệm cho thấy lâu hơn (4.4.2.2). Môi trường đặc có chứa các chất không ổn định và/hoặc các chất hoạt hoá dễ tan chảy lại không nên bảo quản với lượng lớn.

Trước khi sử dụng hoặc trước khi làm nóng tiếp, nên cân bằng nhiệt độ môi trường nuôi cấy đến nhiệt độ môi trường xung quanh.

4.4.2.2 Đánh giá hạn sử dụng

Hạn sử dụng đối với môi trường nuôi cấy đã được bảo quản phải được thiết lập bằng cách kiểm tra môi trường sau khoảng thời gian bảo quản xác định về các đặc tính vật lý, hóa học và vi sinh vật theo quy định trong tiêu chuẩn này. Phòng thử nghiệm phải quy định tần xuất kiểm tra xác nhận.

Kiểm tra sự thay đổi bất kỳ về màu sắc, dấu hiệu bay hơi/mất nước, thay đổi pH hoặc hiệu suất hoặc tính chọn lọc và tính đặc hiệu khi có thể. Hạn sử dụng phải dựa vào thời gian bảo quản mà môi trường vẫn giữ được các tính năng quy định.

CHÚ THÍCH: Việc kiểm tra này cũng thích hợp khi thử kiểm tra các môi trường bẩn sẵn.

4.4.2.3 Bảo quản môi trường trong đĩa Petri

Sử dụng ngay môi trường đóng đặc hoặc bảo quản trong các điều kiện không làm thành phần của môi trường bị biến đổi và mất nước, nghĩa là để ở nơi tối và/hoặc trong tủ lạnh ở $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Dán nhãn trên đáy hoặc mặt bên của đĩa điền ngày tháng chuẩn bị và/hoặc hạn sử dụng và cách nhận biết. Cách khác, có thể sử dụng các hệ thống mã hoá đáp ứng được các yêu cầu này.

Hạn sử dụng của các đĩa thạch sẽ tăng lên nếu được bảo quản trong các túi bằng chất dẻo hoặc cellophan hàn kín. Để giảm thiểu ngưng tụ nước, thì cần làm mát các đĩa trước khi cho vào túi. Không làm khô bề mặt các đĩa thạch trước khi bảo quản lạnh.

4.5 Chuẩn bị để sử dụng

4.5.1 Làm tan chảy môi trường thạch nuôi cấy

Làm tan chảy môi trường nuôi cấy bằng cách đặt trong nồi cách thuỷ hoặc bằng cách khác cho kết quả tương tự [ví dụ: dòng hơi qua hấp áp lực như quy định trong TCVN 6404 (ISO 7218) hoặc TCVN 9716

(ISO 8199)]. Môi trường trước đó đã được hấp áp lực cần được làm nóng lại trong một thời gian tối thiểu để duy trì chất lượng môi trường. Tránh quá nhiệt và khi đã tan chảy thì lấy môi trường ra. Đỗ ở nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian ngắn, ví dụ: 2 min, trước khi đặt vào nồi cách thủy để làm nguội, không làm thủy tinh bị vỡ. Cần nới lỏng nắp đậy trước khi gia nhiệt và vặn chặt trước khi đưa ra khỏi nguồn nhiệt.

Làm nguội môi trường tan chảy duy trì từ 47 °C đến 50 °C trong nồi cách thuỷ kiểm soát được nhiệt độ. Thời gian thực tế cần thiết để đạt được 47 °C đến 50 °C phụ thuộc vào loại môi trường, thể tích và số lượng đơn vị để trong nồi cách thuỷ. Môi trường đã tan chảy thì sử dụng càng sớm càng tốt, nhưng không nên để quá 4 h. Trường hợp môi trường đặc biệt nhạy cảm, thì thời gian giữ môi trường tan chảy phải ngắn hơn, theo quy định trong tiêu chuẩn cụ thể liên quan. Môi trường tan chảy chưa sử dụng không được làm đông đặc lại để sử dụng cho lần sau.

Thiết lập và ghi thành văn bản chế độ điều chỉnh thạch bằng cách cài đặt nhiệt kế trong môi trường thạch trong hộp chứa riêng tương tự như được sử dụng cho môi trường thử nghiệm. Điều này phụ thuộc vào số lượng và kích thước vật chứa đặt vào nồi cách thủy.

CHÚ THÍCH: Môi trường được sử dụng trong phương pháp đỗ đĩa, được bổ sung vào mẫu cần được chỉnh đến 44 °C đến 47 °C, hoặc theo quy định trong tiêu chuẩn liên quan. Sử dụng nồi cách thủy cài đặt ở 44 °C đến 47 °C. Thông tin bổ sung về sử dụng và kiểm tra nồi cách thủy được nêu trong TCVN 6404 (ISO 7218).

4.5.2 Loại khí môi trường nuôi cấy

Đỗ có hàm lượng chính xác không khí/oxy, nếu cần, ngay trước khi sử dụng, làm nóng môi trường trong nồi cách thuỷ đun sôi hoặc dưới dòng hơi nước 15 min, nới lỏng nắp; sau khi làm nóng, vặn chặt nắp và làm nguội nhanh đến nhiệt độ làm việc.

4.5.3 Thêm chất bổ sung

Các thành phần không bền nhiệt cần được bổ sung vào môi trường sau khi đã làm nguội đến dưới 50 °C. Nếu môi trường chứa thạch, để cho chất bổ sung vô trùng cân bằng đến nhiệt độ phòng trước khi bổ sung vào môi trường thạch. Việc thêm các chất bổ sung lạnh dạng lỏng có thể làm cho thạch đông lại hoặc tạo thành các lớp vẩy trong suốt làm cho phân bố không đúng. Cần thực hiện theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhẹ nhàng trộn kỹ tất cả các thành phần vào môi trường và phân phôi vào các hộp chứa cuối cùng càng nhanh càng tốt.

4.5.4 Chuẩn bị môi trường đặc trong các đĩa Petri

Rót môi trường thạch nuôi cấy đã tan chảy vào các đĩa Petri sao cho thu được một lớp dày ít nhất là 3 mm (đối với các đĩa có đường kính 90 mm, 18 ml đến 20 ml thạch thường là đủ) hoặc theo quy định trong tiêu chuẩn liên quan. Nếu các đĩa được bảo quản hoặc nếu ủ ấm quá 72 h, hoặc nhiệt độ ủ trên 40 °C, thì cần đến một lượng môi trường nuôi cấy lớn hơn. Đỗ thạch nguội và đông đặc lại bằng cách đặt các đĩa cùng với nắp trên mặt phẳng nằm ngang, ở nơi mát.

Các đĩa môi trường nuôi cấy đã chuẩn bị sẵn để sử dụng ngay cần được bảo quản và sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.5.5 Chuẩn bị môi trường đồ đĩa để nuôi cấy

Để nuôi cấy bề mặt môi trường đặc, thì cần làm khô nhanh các đĩa ngay trước khi sử dụng, cho đến khi không còn các giọt nước trên bề mặt môi trường. Không làm quá khô bề mặt thạch.

Để làm khô các đĩa, các điểm sau đây rất quan trọng:

- Độ ẩm của môi trường nuôi cấy là quan trọng vì việc phát triển tối ưu vi khuẩn phụ thuộc vào các điều kiện ẩm trong và trên môi trường. Ví dụ việc thoát quá nhiều nước có thể dẫn đến tăng nồng độ các chất gây ức chế trong môi trường nuôi cấy chọn lọc và giảm hoạt độ nước trên bề mặt môi trường.
- Khi vi khuẩn được nuôi cấy không lan nhanh và các đĩa khô do thời tiết thì không cần phải làm khô. Trong trường hợp này, có thể bỏ qua quy trình sấy vì chỉ làm tăng khả năng nhiễm bẩn và thoát nước không cần thiết.
- Chọn nhiệt độ và thời gian làm khô sao cho môi trường càng ít bị nhiễm bẩn càng tốt và việc gia nhiệt không ảnh hưởng đến chất lượng môi trường nuôi cấy. Thời gian làm khô phụ thuộc vào mức độ ngưng tụ nước trong đĩa Petri, nhưng phải càng ngắn càng tốt.
- Để tránh nhiễm bẩn và nếu các đĩa không làm khô trong tủ sấy thì các đĩa phải được làm khô bằng cách úp ngược đĩa với bề mặt môi trường nuôi cấy lật úp.

Trong thực tế, các đĩa có thể được làm khô bằng cách đặt đĩa với bề mặt thạch lật úp và mở nắp một nửa và để trong tủ ở nhiệt độ từ 25 °C đến 50 °C. Làm khô các đĩa cho đến khi hết hẳn các giọt nước trên bề mặt nắp. Không làm khô thêm. Các đĩa thạch cũng có thể được làm khô với bề mặt thạch hướng lên trên để trong tủ cấy (ở nhiệt độ phòng) từ 30 min đến 60 min hoặc đậy nắp để qua đêm ở nhiệt độ phòng.

4.6 Ủ ẩm môi trường đặc trong các đĩa Petri

Trong quá trình ủ ẩm, môi trường thạch sẽ mất nước. Trong một số trường hợp, điều này có thể ảnh hưởng đến sự phát triển của các vi sinh vật. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự mất nước là thành phần môi trường, lượng môi trường trong đĩa, kiểu tủ ẩm có quạt hoặc khác, độ ẩm của không khí trong tủ ẩm, vị trí và số lượng đĩa trong tủ ẩm và nhiệt độ ủ. Có thể giảm thiểu việc mất nước bằng cách chồng sáu đĩa đặt vào túi chất đèo mờ miệng phía trên (để tránh ngưng tụ nhiều nước). Cách khác, có thể làm tăng độ ẩm của không khí trong tủ ẩm bằng cách đặt hộp đựng nước ở phía dưới. Thường xuyên thay nước để tránh nhiễm nấm mốc.

4.7 Thải bỏ môi trường

Thải bỏ môi trường bị nhiễm bẩn và không sử dụng theo cách an toàn và đáp ứng được các quy định hiện hành.

5 Vệ sinh vật thử nghiệm để thử hiệu năng

5.1 Yêu cầu chung

Các tiêu chuẩn mới hoặc đã được soát xét phải quy định rõ phép thử hiệu năng của môi trường nuôi cáy, bao gồm quy định về các chủng kiểm chứng và các tiêu chí chấp nhận, theo Phụ lục J.

5.2 Chọn vi sinh vật thử nghiệm

Bộ vi sinh vật thử nghiệm cần có các vi sinh vật có các đặc tính ổn định đại diện cho các loài và có thể tin cậy đối với việc thể hiện hiệu năng tối ưu của môi trường được phòng thử nghiệm chuẩn bị cụ thể. Các vi sinh vật thử nghiệm gồm các chủng có sẵn trong các bộ sưu tập giống đối chứng, nhưng cũng có thể bao gồm các chủng đặc trưng do phòng thử nghiệm phân lập. Các đặc trưng nuôi cáy liên quan của chủng gốc đối chứng cần được kiểm tra và được phòng thử nghiệm ghi lại hoặc chọn chủng mới nếu xuất hiện các đặc trưng không điển hình. Tốt nhất là sử dụng các chủng có nguồn gốc từ thực phẩm hoặc từ nước cho dù không phải tất cả các bộ sưu tập các chủng nuôi cáy đều cung cấp các dữ liệu đó về nguồn gốc xuất xứ của chúng.

Các đặc trưng về giống của gốc đối chứng liên quan phải được phòng thử nghiệm kiểm tra và ghi lại. Nếu có sự biến đổi về chủng, thì nghiên cứu các khả năng ảnh hưởng của môi trường nuôi cáy bằng cách thu thập cùng một môi trường từ các nhà sản xuất khác nhau và thu lấy các giống đối chứng bổ sung từ bộ sưu tập giống.

LƯU Ý: Người sử dụng cần phản hồi thông tin liên quan đến các biến đổi về chủng và hiệu năng.

Các vi sinh vật thử nghiệm đối với mỗi môi trường có thể bao gồm:

- các chủng dương tính mạnh với các đặc trưng điển hình của vi sinh vật đích;
- các chủng dương tính yếu;
- các chủng âm tính không cho thấy các đặc tính mong đợi của vi sinh vật đích (các đặc trưng âm tính);
- các chủng bị ức chế một phần hoặc hoàn toàn.

Phụ lục E đưa ra các vi sinh vật thử nghiệm được sử dụng trong các tiêu chuẩn vi sinh vật trong thực phẩm và Phụ lục F đưa ra các vi sinh vật thử nghiệm được sử dụng trong các tiêu chuẩn vi sinh vật trong nước.

CHÚ THÍCH Một vài hạn chế của quốc gia và một vài hướng dẫn yêu cầu sử dụng các typ huyết thanh khác với các typ huyết thanh quy định trong các Bảng này. Nêu rõ các yêu cầu của quốc gia liên quan đến việc chọn các typ huyết thanh *Salmonella*.

5.3 Bảo quản và duy trì các vi sinh vật thử nghiệm

5.3.1 Yêu cầu chung

Hiện nay có sẵn một vài phương pháp bảo quản và duy trì thành công tất cả các vi sinh vật liên quan đến vi sinh vật trong thực phẩm và trong nước, ví dụ: đông khô, bảo quản các hạt ở -70°C , hoặc sử dụng nitơ lỏng. Một phương pháp có thể không thích hợp cho tất cả các chủng. Các phương pháp bổ sung để bảo quản các vi sinh vật nêu trong [14], [15], [36], [37] và [38].

Số lượng vi sinh vật thử nghiệm được cấy chuyền cần được lập thành văn bản để ngăn ngừa cây chuyền quá nhiều làm tăng nguy cơ biến đổi kiểu hình. Một lần cấy chuyền được xác định là chuyển từ giống vi sinh vật sống sang môi trường mới với sự phát triển của các vi sinh vật. Mọi kiểu cây chuyền được coi là dạng cây chuyền/chuyển sang. Thông tin bổ sung có trong [27], [28], [35], [38].

Xem sơ đồ trong B.1, B.2 và Phụ lục B về thông tin bổ sung để duy trì và chuẩn bị.

5.3.2 Vi sinh vật thử nghiệm từ các nguồn thương mại

Nếu các vi sinh vật thử nghiệm thu được từ các bộ sưu tập chuẩn hoặc các nhà cung cấp được cấp chứng chỉ ISO 9001[2] hoặc chứng nhận thích hợp khác và được giữ trong các hộp đựng gốc, thì phải sử dụng và nuôi cây theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phòng thử nghiệm cần chắc chắn rằng chủng được cung cấp là chủng đối chứng hoặc gốc đối chứng và bao nhiêu lần cây chuyền đã được thực hiện trước khi nhận và tài liệu về thông tin liên quan.

Phòng thử nghiệm cần kiểm tra sự có mặt các đặc tính mong đợi.

5.3.3 Chủng gốc đối chứng được chuẩn bị trong phòng thử nghiệm

Các giống gốc của các chủng đối chứng (xem Hình B.1) dùng cho các mục đích thử hiệu năng phải được duy trì và xử lý theo cách sao cho giảm thiểu khả năng nhiễm chéo, biến đổi hoặc thay đổi các tính chất điển hình. Các gốc đối chứng cần được bảo quản với các lượng nhỏ, thường được duy trì ở nhiệt độ đông lạnh sâu (ví dụ, dưới -70°C) hoặc đông khô. Ở nhiệt độ cao hơn thì thời gian sống có thể giảm và có sự biến đổi về di truyền.

Các đặc trưng phát triển của chúng cần được lập thành văn bản đầy đủ cho từng môi trường mà trên/trong đó các chủng này được sử dụng làm sinh vật thử nghiệm.

Các gốc đối chứng không được dùng để chuẩn bị các chủng đối chứng.

5.3.4 Giống gốc

Cáy giống gốc thường được chuẩn bị từ gốc đồi chứng đồng sâu hoặc đồng khô (xem Hình B.2). Các lượng nhỏ phải được xử lý theo cách sao cho tránh được nhiễm bẩn chéo gốc đồi chứng và/hoặc suy giảm chất lượng của chúng. Các giống gốc cần được chuẩn bị bằng cách hoà lại một lượng gốc đồi chứng trong hoặc trên môi trường phát triển không chọn lọc và ủ để tạo ra giống pha tĩnh.

Xem 5.3.3 về các yêu cầu bảo quản và hồ sơ lưu trữ.

Đối với các hệ thống bảo quản có bán sẵn, cần tuân thủ nghiêm ngặt các hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các giống gốc không được dùng để chuẩn bị các chủng đồi chứng hoặc gốc đồi chứng.

5.3.5 Giống làm việc

Các giống làm việc phải được chuẩn bị từ giống gốc hoặc gốc đồi chứng và được sử dụng để chuẩn bị giống thử nghiệm.

Các giống làm việc không được dùng để chuẩn bị các chủng đồi chứng, gốc đồi chứng hoặc giống gốc hoặc tạo ra giống làm việc tiếp theo.

5.4 Vi sinh vật để thử hiệu năng

5.4.1 Yêu cầu chung

Các vi sinh vật thích hợp để thử hiệu năng thông thường được nêu trong các Phụ lục E và F.

Các thể tích dịch cây và số lượng vi sinh vật được sử dụng, xem 5.4.2.4 và 5.4.2.5.

Hướng dẫn dưới đây là một ví dụ về quy trình thích hợp để tạo ra dịch cây tiêu chuẩn để kiểm soát chất lượng môi trường. Các quy trình này được áp dụng trong trường hợp chung nhưng một số sinh vật có thể yêu cầu các điều kiện chuẩn bị đặc biệt, ví dụ: các sinh vật kị khí, ưa mặn, ưa tham thấu và các vi sinh vật có yêu cầu phát triển hoặc dinh dưỡng đặc biệt.

5.4.2 Chuẩn bị

5.4.2.1 Chuẩn bị giống gốc

Khi yêu cầu cây gốc đồi chứng vào môi trường đặc, ví dụ thạch trypton đậu tương (TSA) hoặc TSA máu, cây sáo cho thu được các khuẩn lạc mọc đơn lẻ. Ở trong các điều kiện thích hợp, ví dụ: các vi khuẩn hiếu khí ở 37 °C trong khoảng từ 18 h đến 24 h.

Kiểm tra giống gốc trên môi trường đặc về độ thuần khiết và sử dụng trong khoảng thời gian quy định (ví dụ: 14 ngày ở nhiệt độ thích hợp để tránh làm thay đổi đáng kể vi sinh vật).

5.4.2.2 Chuẩn bị giống làm việc

Các giống làm việc phải được chuẩn bị từ gốc đối chứng (hoặc khi cần thì từ giống gốc) như giống pha tinh thuần kiết trong môi trường canh thang không chọn lọc. Đối với nhiều vi khuẩn hiểu khí thường thu được bằng cách ủ ấm 18 h đến 24 h.

Giống làm việc có thể được chuẩn bị từ chất chuẩn thương mại RM hoặc CRM hoặc được chuẩn bị trong phòng thử nghiệm. Nồng độ của huyền phù được chuẩn bị phải ổn định và đồng nhất trong suốt quá trình sử dụng [7], [10], [11], [21], [29] và [30].

Có thể sử dụng các kỹ thuật khác nhau, nhưng phải đảm bảo độ thuần của dịch cấy, cũng như sự chuẩn hóa để cho phép sử dụng về sau.

Tùy thuộc vào kích thước khuẩn lạc, lấy một đến hai khuẩn lạc từ môi trường giống gốc bằng vòng cấy. Nên sử dụng vòng cấy 1 µl để tránh lấy quá nhiều dịch cấy.

Chuyển dịch cấy lên môi trường lòng không chọn lọc, ví dụ: canh thang trypton đậu tương (TSB) và trộn kỹ trên máy trộn vortex.

Ủ ấm trong các điều kiện và thời gian thích hợp (ví dụ: đối với phần lớn các vi khuẩn hiểu khí thường ủ ở 37 °C trong 18 h đến 24 h).

Sử dụng giống làm việc này trong khoảng thời gian quy định (ví dụ: tối đa ba ngày ở nhiệt độ thích hợp để tránh làm thay đổi đáng kể vi sinh vật).

Chuẩn bị và bảo quản các bào tử nấm và vi khuẩn dùng làm giống làm việc. xem [10], [11], [24], [25] và [30].

5.4.2.3 Chuẩn bị các huyền phù (dịch cấy) để thử nghiệm

Chuẩn bị các dãy dung dịch pha loãng trong các dịch pha loãng thích hợp (ví dụ: dung dịch Ringer nồng độ ¼, dung dịch muối pepton) và sử dụng bước pha loãng thích hợp nhất đối với số lượng vi sinh vật mong muốn (cfu) trong một thể tích quy định.

Dung dịch pha loãng thích hợp được sử dụng làm dịch cấy thử nghiệm cần được xác định từ các phép thử trước đó trong các điều kiện chuẩn hóa nghiệm ngặt đối với tất cả các bước.

Sử dụng các huyền phù (dịch cấy) trong thời gian quy định (ví dụ: đến 2 h ở nhiệt độ phòng hoặc trong 24 h nếu được bảo quản ở 5 °C ± 3 °C hoặc thời gian bảo quản lâu hơn nếu đã được đánh giá hiệu lực [10], [21]).

Có thể sử dụng dịch cấy đông lạnh nếu cho thấy vi sinh vật có thể sống trong thời gian được chọn.

5.4.2.4 Thể tích dịch cấy

Thể tích dịch cấy được sử dụng cho phép thử hiệu năng định lượng phải phản ánh được các dịch cấy sử dụng trong các điều kiện thử nghiệm đối với môi trường liên quan.

Đối với dịch pha loãng và môi trường lỏng được sử dụng cho phép thử định lượng, thì thể tích dịch cấy phải có cùng tỷ lệ với thể tích dịch cấy được sử dụng trong tiêu chuẩn liên quan, thường là 10 % môi trường cần thử.

5.4.2.5 Mức dịch cấy

5.4.2.5.1 Mức dịch cấy để thử hiệu suất

5.4.2.5.1.1 Phép thử định lượng

Đối với phép thử định lượng, thì mức ở khoảng 10^2 cfu là cần thiết để đạt được độ chụm đầy đủ (xem Bảng 1). Phép thử này có thể cần sử dụng nhiều hơn một đĩa kép.

Cần sử dụng đài thực tế từ 80 cfu đến 120 cfu trên đĩa với số đếm tối thiểu 50 cfu trên đĩa. Đối với các bộ lọc, số đếm cfu tương tự cần đến việc sử dụng một hoặc nhiều màng lọc. Bảng 1 cho thấy mức tin cậy 95 % liên quan đến số đếm khuẩn lạc.

Đối với các phép thử định lượng của dịch pha loãng và môi trường vận chuyển lỏng, thì mức dịch cấy ở khoảng 10^3 đến 10^4 cfu là cần thiết để đạt được dịch cấy ở khoảng 100 cfu trong thể tích được dàn trên đĩa.

Bảng 1 – Mức tin cậy 95 % đối với số lượng khuẩn lạc giả định thống nhất với phân bố Poisson^{[21], [26]}

Số lượng khuẩn lạc đếm được	Giới hạn độ chụm (chính xác đến phần trăm) %	Giới hạn tin cậy xấp xỉ 95 %
500	± 9	455 đến 545
400	± 10	360 đến 440
320	± 11	284 đến 356
200	± 14	172 đến 228
100	± 20	80 đến 120
80	± 22	62 đến 98
50	± 28	36 đến 64
30	± 37	19 đến 41
20	± 47	11 đến 29
16	± 50	8 đến 24
10	± 60	4 đến 16
6	± 83	1 đến 11

5.4.2.5.1.2 Phép thử định tính

Thể tích được sử dụng cho phép thử cần chứa:

- 10^3 cfu đến 10^4 cfu cho các phép thử định tính môi trường đỗ đĩa;
- ≤ 100 cfu cho các phép thử hiệu suất của các môi trường tăng sinh và tăng sinh sơ bộ;
- 10^4 cfu đến 10^6 cfu cho các phép thử định tính môi trường vận chuyển đặc.

5.4.2.5.2 Mức vi sinh vật trong dịch cây đối với phép thử tính chọn lọc

Đối với các phép thử tính chọn lọc của môi trường nuôi cây, nuôi cây huyền phù vi sinh vật không phải đích có chứa từ 10^4 cfu đến 10^8 cfu lên đĩa thạch hoặc vào ống đựng môi trường.

5.4.2.5.3 Mức vi sinh vật trong dịch cây đối với phép thử tính đặc hiệu

Đối với các phép thử định tính của môi trường đỗ đĩa, về tính đặc hiệu cần đến 10^3 cfu đến 10^4 cfu.

5.4.2.6 Ủ

Ü môi trường đã cây theo các điều kiện quy định trong các tiêu chuẩn liên quan. Phụ lục E nêu các điều kiện ü được sử dụng trong các tiêu chuẩn quy định đối với vi sinh vật trong thực phẩm và Phụ lục F nêu các điều kiện ü được sử dụng trong các tiêu chuẩn quy định đối với vi sinh vật trong nước.

Tránh thất thoát nước trong môi trường thạch trong quá trình ü, xem 4.6.

Cần sử dụng thời gian ü ngắn nhất trong tiêu chuẩn được dùng đối với vi sinh vật đích, trong khi thời gian ü cho phép lâu nhất cần được sử dụng khi xác định tính chọn lọc [10].

6 Kiểm soát chất lượng và thử hiệu năng của môi trường nuôi cây

6.1 Yêu cầu chung

Các điều sau đây mô tả các yêu cầu đối với tất cả các môi trường nuôi cây. Các yêu cầu này có thể áp dụng cho mọi cơ sở môi trường nuôi cây.

Thực tế, các mẫu có thể chứa các vi sinh vật bị ức chế. Tính phù hợp của môi trường liên quan đến độ phục hồi của các tế bào bị ức chế cần được tính đến [21], [31], [32], [33].

Chất lượng của môi trường nuôi cây phụ thuộc vào chất lượng của các thành phần cơ bản, công thức đúng, chất lượng của quy trình chuẩn bị, việc loại trừ nhiễm khuẩn và các điều kiện bao gói và bảo quản.

Kiểm soát chất lượng môi trường nuôi cấy phải phù hợp với việc sử dụng của môi trường (ví dụ: định tính hoặc định lượng). Trước khi sử dụng, hiệu năng của từng mẻ môi trường nuôi cấy phải được thử nghiệm phân loại môi trường trong 6.4. Nếu không thể thực hiện phép thử trước khi sử dụng do tính không ổn định của môi trường hoặc bổ sung, thì phải thực hiện phép thử hiệu năng song song với việc thử nghiệm mẫu.

6.2 Kiểm soát chất lượng lý - hóa

Môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh phải phù hợp về các tính chất lý-hóa như quy định trong tiêu chuẩn tương ứng. Ngoài ra, việc đánh giá chất lượng bằng kiểm tra cảm quan phải đảm bảo từng môi trường nuôi cấy đều đáp ứng được các yêu cầu quy định, ví dụ:

- lượng phân phối và/hoặc độ dày;
- bề ngoài, màu sắc và tính đồng nhất;
- độ đồng đặc;
- độ ẩm;

Ngoài ra, phải xác định trị số pH.

Các thành phần riêng lẻ và mọi thành phần bổ sung chọn lọc hoặc thành phần dinh dưỡng phải được đánh giá chất lượng bằng các quy trình thích hợp.

6.3 Kiểm soát chất lượng vi sinh vật

6.3.1 Yêu cầu chung

Việc thực hiện các phép thử hiệu năng về vi sinh phải được tiến hành trên mẫu đại diện của mẻ sản phẩm cuối cùng [6], [8], [9], [21].

6.3.2 Môi trường đối chứng

Để có được độ tin cậy của các kết quả phép thử hiệu năng, thì phải sử dụng môi trường đối chứng có chất lượng phù hợp cao.

Các ví dụ cần được người sử dụng xem xét như sau:

- sử dụng RM định lượng (xem 3.4.6) có chứa một lượng xác định các vi sinh vật khi đánh giá môi trường đối chứng;
- sử dụng quá trình sản xuất xác định kể cả việc làm tan chảy, nếu có thể;
- sử dụng cùng một cơ sở sản xuất/nguồn gốc môi trường/các thành phần;

- sử dụng một lượng lớn vi sinh vật khi thử kiểm tra (để bao trùm dải vi sinh vật cần tìm);
- chọn “môi trường đối chứng” cho mục đích đánh giá;
- các quy trình thích hợp để đảm bảo chất lượng khi sử dụng môi trường đối chứng.

Có thể không cần thiết phải bao gồm tất cả các nội dung trên khi đánh giá sự phù hợp của môi trường đối chứng. Phòng thử nghiệm phải tự chọn quy trình phù hợp cho mình.

Các vi sinh vật thử nghiệm phù hợp, phương pháp kiểm soát và các tiêu chí chấp nhận đối với môi trường đối chứng thạch trypton đậu tương (TSA) được nêu trong các Phụ lục E và F. Có thể sử dụng các môi trường đối chứng không chọn lọc khác nếu đáp ứng được các tiêu chí trên.

6.3.3 Kiểm tra mức độ nhiễm vi khuẩn (kiểm tra độ vô trùng)

Cần phải kiểm tra mức độ nhiễm vi khuẩn (độ vô trùng) của một lượng môi trường nuôi cấy thích hợp, tùy thuộc vào cỡ của mẻ bằng cách ủ ấm ở các điều kiện thích hợp.

Các mẫu thử nghiệm phải ít nhất là một đĩa hoặc một ống cho các mẻ nhỏ (< 100 đơn vị). Đối với các mẻ lớn hơn, người sản xuất phải lấy theo quy định, ví dụ: dựa vào các thành phần môi trường, thông số quá trình, các giới hạn và kiểu bao gói, sử dụng các giới hạn chất lượng được chấp nhận. Thông tin bổ sung được nêu trong TCVN 7790-1 (ISO 2859-1) [6] ngoài các tiêu chuẩn quốc gia khác và các nguồn khác [9], [21].

Các tiêu chí chấp nhận phải được thiết lập và điều chỉnh đối với từng môi trường.

6.4 Yêu cầu chung đối với phép thử hiệu năng vi sinh vật

6.4.1 Yêu cầu chung

Để đánh giá mẻ môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh, thành phần dinh dưỡng hoặc các chất bổ sung, sự phát triển phải được đánh giá thích hợp bằng các phương pháp định tính hoặc định lượng nêu trong tiêu chuẩn này.

Sử dụng thiết bị thích hợp và thực hiện kỹ thuật nuôi cấy nêu trong các tiêu chuẩn liên quan, nuôi cấy các môi trường nuôi cấy lỏng hoặc bán đặc với một lượng thích hợp (5.4.2.4) giống làm việc của mỗi vi sinh vật thử nghiệm xác định, xem Phụ lục E và Phụ lục F.

Các ví dụ về phương pháp thử định tính và định lượng đối với môi trường nuôi cấy đặc và lỏng được nêu trong tiêu chuẩn này. Có thể chọn phương pháp bất kỳ khác và không phải sử dụng tất cả các phương pháp.

Khi môi trường nuôi cấy được sử dụng để đếm vi sinh vật, phải thực hiện các phương pháp thử định lượng.

Khi cần đánh giá môi trường nuôi cấy mới hoặc nhà sản xuất mới, nên thực hiện các phương pháp thử định lượng để cung cấp thông tin bổ sung về sự thay đổi.

Trong môi trường lỏng, các tương tác dẫn đến sự phát triển các vi sinh vật rất phức tạp, do đó, các phương pháp thử hiệu năng cũng phức tạp hơn.

Đối với phép thử nghiệm các hỗn hợp môi trường đặc bằng các bộ lọc màng, sử dụng ISO 7704.

Thông thường các kỹ thuật vi sinh là giả định và do đó, các phương pháp không đưa ra chi tiết cụ thể.

Các vi sinh vật thử nghiệm thích hợp, các phương pháp kiểm soát và các tiêu chí chấp nhận được liệt kê trong Phụ lục E và Phụ lục F.

Tần suất thử nghiệm phải do người sử dụng điều chỉnh, có tính đến phạm vi chuẩn bị trong phòng thử nghiệm của người sử dụng cuối cùng và mức đảm bảo chất lượng tại đó.

6.4.2 Môi trường sử dụng ngay

Các nhà sản xuất môi trường sử dụng ngay có bán sẵn trên thị trường, đặc biệt nếu đã được chứng nhận phù hợp với TCVN ISO 9001, phải có sẵn chương trình chất lượng và có thẻ kèm theo chứng chỉ về chất lượng của môi trường mà họ cung cấp. Trong các điều kiện này, người sử dụng có thể không cần phải thử nghiệm thêm về môi trường đó nhưng cần đảm bảo rằng các điều kiện bảo quản được duy trì theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đối với môi trường hoàn chỉnh sử dụng ngay có chất bổ sung, chất lượng đã được nhà sản xuất kiểm soát phù hợp với tiêu chuẩn quy định, thì ít nhất nên có phép thử định tính.

Người sử dụng phải chắc chắn rằng nhà sản xuất các môi trường để sử dụng ngay có bán sẵn trên thị trường đều có chương trình chất lượng đối với các sản phẩm này và các chứng chỉ kiểm soát chất lượng đáp ứng các yêu cầu của tiêu chuẩn này, thỏa mãn các kết quả dự kiến và kết quả thu được. Phòng thử nghiệm sử dụng cũng phải kiểm tra các tài liệu bằng chứng để đảm bảo rằng các tiêu chí chấp nhận của nhà sản xuất về phép thử hiệu năng đáp ứng các yêu cầu nội bộ của phòng thử nghiệm.

Phải định kỳ kiểm tra để chứng minh chất lượng của môi trường được duy trì trong quá trình vận chuyển.

Cũng cần phải kiểm tra sau bảo quản và xử lý tiếp trong phòng thử nghiệm, ví dụ: sự tan chảy của môi trường. Điều chỉnh tần xuất kiểm tra.

Đối với môi trường không hoàn chỉnh cần được phòng thử nghiệm thêm các chất bổ sung (xem 3.3.5.1), thì kiểm tra việc bổ sung bằng các hồ sơ hoặc thực hiện các phép thử định tính để đảm bảo rằng chất bổ sung được thêm đúng.

6.4.3 Môi trường được chuẩn bị từ các công thức thành phần khô bán sẵn trên thị trường

Đối với môi trường để đếm vi sinh vật, thì phải thực hiện phép thử định lượng. Đối với các môi trường khác thì chỉ cần phép thử định tính là đủ. Các phép thử định lượng cho độ đảm bảo chất lượng môi trường cao hơn.

Đối với các môi trường không quy định trong Phụ lục E và Phụ lục F thì việc kiểm soát chất lượng cần quy định theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đối với các môi trường không chứa các chất chỉ thị hoặc các chất chọn lọc, thì sử dụng một số lượng hạn chế chủng thử nghiệm. Đối với các môi trường có chứa các chất chỉ thị hoặc chất chọn lọc, thì sử dụng các chủng chỉ thị hoặc chọn lọc. Đối với môi trường phức hợp, nghĩa là có chất bổ sung thì mỗi mẻ cần được kiểm tra với các chủng có các đặc trưng được liệt kê trong 5.2.

6.4.4 Môi trường được chuẩn bị từ các thành phần cơ bản riêng rẽ

Ngoài các yêu cầu nêu trong 6.4.3, thì cần tiến hành phép thử định lượng để kiểm tra chiều hướng chất lượng của vật liệu cơ bản, hiệu suất của môi trường và các quy trình chuẩn bị sản xuất trong phòng thử nghiệm.

6.5 Đánh giá hiệu năng và diễn giải các kết quả

Mỗi môi trường nuôi cấy cho thấy đáp ứng nếu tất cả các vi sinh vật thử nghiệm được sử dụng thực hiện theo các quy định kỹ thuật. Môi trường được chấp nhận nếu cả tiêu chí chung lẫn các tiêu chí chất lượng được đáp ứng.

Nếu không đáp ứng yêu cầu về hiệu năng, xem Phụ lục H.

6.6 Môi trường khẳng định và thuốc thử

6.6.1 Môi trường khẳng định

Hiệu năng của môi trường nuôi cấy được sử dụng cho các phép thử khẳng định phải được xác nhận trước khi sử dụng. Các vi sinh vật thử nghiệm âm tính và dương tính thích hợp phải được sử dụng để xác nhận theo cách tương tự trong các tiêu chuẩn cụ thể [9], [16].

6.6.2 Thuốc thử khẳng định

Hiệu năng của các dung dịch nhuộm Gram, các thuốc thử như Kovac, VP, nitrit, oxydase, catalase và các thuốc thử khác được sử dụng để chứng minh các đặc tính sinh hóa phải được kiểm tra xác nhận hiệu năng trước khi sử dụng. Các chủng âm tính, dương tính phải được sử dụng để đánh giá xác nhận và hạn sử dụng phải được thiết lập. Cần sử dụng các thuốc thử thuộc loại tinh khiết phân tích cho các

phép thử khẳng định. Nếu sử dụng các loại thuốc thử thương mại, thì tuân thủ các hướng dẫn của nhà sản xuất về bảo quản và sử dụng [18], [19].

7 Phương pháp thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy đặc

7.1 Yêu cầu chung

Điều này mô tả phép thử hiệu năng định tính và định lượng đối với môi trường nuôi cấy đặc được quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể áp dụng cho thực phẩm và nước. Đây là các phương pháp chung đối với hầu hết các môi trường nuôi cấy. Các phương pháp này có thể không thích hợp cho phép thử một số kiểu môi trường về độ thu hồi nấm mốc. Sơ đồ tóm tắt của phương pháp có trong Phụ lục C.

7.2 Phương pháp thử định lượng

7.2.1 Phương pháp thử định lượng – Các định nghĩa

7.2.1.1 Hiệu suất

Hiệu suất phải đạt được giới hạn xác định tối thiểu (xem tiêu chuẩn cụ thể liên quan hoặc các Phụ lục E và Phụ lục F).

Xem Phụ lục G về sử dụng sơ đồ kiểm soát để thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy đặc bằng quy trình quy định dưới đây.

Đối với các phương pháp định lượng, hệ số hiệu suất P_R [21] được xác định theo Công thức (1):

$$P_R = \frac{N_s}{N_0} \quad (1)$$

Trong đó

N_s là số đếm khuẩn lạc tổng số thu được trên hoặc trong môi trường nuôi cấy cần thử, nghĩa là số đếm khuẩn lạc trên các đĩa;

N_0 là số đếm khuẩn lạc tổng số thu được trên môi trường nuôi cấy đối chứng thu được từ một hoặc nhiều đĩa và phải ≥ 100 cfu, xem 5.4.2.5.1.

Diễn giải các kết quả, xem 7.2.2.1.2.

7.2.1.2 Tính chọn lọc

Môi trường nuôi cấy chọn lọc và môi trường đối chứng không chọn lọc được cấy cùng các vi sinh vật không phải đích ở các độ pha loãng khác nhau.

Hệ số chọn lọc, S_F [22], được tính bằng Công thức (2):

$$S_F = D_0 - D_s \quad (2)$$

Trong đó

D_0 là độ pha loãng cao nhất có vi sinh vật phát triển trên môi trường đối chứng không chọn lọc;

D_s là độ pha loãng cao nhất có vi sinh vật phát triển tắt trên môi trường thử nghiệm chọn lọc;

S_F , D_0 và D_s được biểu thị bằng đơn vị \log_{10} .

CHÚ THÍCH: Ví dụ, nếu $D_0 10^{-4} = \log_{10} 4,0$ và $D_s 10^{-3} = \log_{10} 3,0$ thì hệ số chọn lọc $S_F \approx 1,0$.

Điển giải kết quả, xem 7.2.2.1.2.

7.2.2 Phương pháp thử định lượng đối với môi trường nuôi cấy đặc

7.2.2.1 Yêu cầu chung

Quy trình này cần sử dụng huyền phù vi khuẩn đã được định lượng (có thể là huyền phù mẫu thử/vật liệu chuẩn định lượng được) có nồng độ thích hợp với chủng đích. Độ thu hồi của mè môi trường nuôi cấy mới được so sánh với độ thu hồi của môi trường nuôi cấy không chọn lọc (môi trường đối chứng) hoặc trong các trường hợp đặc biệt, được so sánh với mè đã được chấp nhận trước đó của thành phần môi trường tương tự.

7.2.2.1.1 Cách tiến hành

a) Sử dụng các giống làm việc và dịch cấy có nồng độ thích hợp biết trước của chủng đích và chủng cấy không phải đích trong 5.3.2 hoặc RM thích hợp.

b) Cần sử dụng một hoặc nhiều đĩa cho mỗi vi sinh vật. Số đếm được sử dụng phụ thuộc vào cỡ của mè, độ tin cậy trong quy trình sản xuất đảm bảo chất lượng, độ tin cậy và mức vi sinh vật trong huyền phù mẫu thử.

c) Đảm bảo rằng bề mặt các đĩa là khô hoàn toàn, xem 4.5.5.

d) Nuôi cấy bằng cách dàn dịch cấy trên môi trường hoặc bằng phương pháp lọc màng để cho các số đếm nằm trong các giới hạn khuyến cáo nêu trong 5.4.2.5.1 đối với phép thử định lượng.

Phương pháp nhỏ giọt bề mặt Miles-Mitsa cải biến, các hệ thống nhỏ giọt khác hoặc đồ đĩa xoắn cũng có thể được sử dụng để có được các khuẩn lạc có thể đếm được trên đĩa.

– Đối với các môi trường nuôi cấy thường được sử dụng để định lượng theo cách này thì phải sử dụng phương pháp đồ đĩa.

– Nuôi cấy môi trường đối chứng hoặc các đĩa từ các mè được chấp nhận trước đó theo cách tương tự.

- Ủ ám các đĩa với các điều kiện quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể.
- Đếm các khuẩn lạc có mặt trên mỗi đĩa. Đánh giá kích thước và hình thái của các khuẩn lạc trên hoặc trong môi trường thử nghiệm bằng cách so sánh với độ thu hồi trên môi trường nuôi cấy không chọn lọc (môi trường đối chứng) hoặc mè đã được chấp nhận trước đó của thành phần môi trường tương tự.

7.2.2.1.2 Tính kết quả và diễn giải kết quả

Đối với phép thử định lượng, khoảng 100 cfu là cần thiết để đảm bảo độ chum (xem Bảng 1). Có thể cần phải sử dụng nhiều đĩa cho mỗi lần lặp lại.

Các kết quả được chấp nhận có hiệu lực nếu đáp ứng các điều kiện sau đây:

- Mỗi lặp lại phải cho kết quả dương tính (có phát triển vi khuẩn đích);
- Mỗi kết quả báo cáo riêng lẻ bao gồm trong dải phân tích chuẩn (đến 100 khuẩn lạc đối với các phương pháp lọc và đến 150 khuẩn lạc đối với các phương pháp bề mặt).

Diễn giải các kết quả, tính hệ số hiệu suất P_R (xem 7.2.1.1) và khi thích hợp, hệ số chọn lọc, S_F (xem 7.2.1.2).

- a) P_R phải $\geq 0,50$ để so sánh môi trường chọn lọc với môi trường đối chứng không chọn lọc quy định trong Phụ lục E và Phụ lục F. P_R phải $\geq 0,70$ để so sánh môi trường không chọn lọc với môi trường đối chứng không chọn lọc hoặc như quy định trong Phụ lục E và Phụ lục F. Điều này có thể áp dụng cho các trường hợp đặc biệt khi so sánh với mè trước đó.
- b) Nếu P_R vượt quá 1,4 thì phải tìm ra nguyên nhân.
- c) S_F của các vi sinh vật không phải đích ít nhất phải bằng 2.

Đối với các trường hợp đặc biệt, xem các Phụ lục S, F và I. Các tiêu chí này có thể không thích hợp cho các môi trường không được quy định trong các Phụ lục E và F ví dụ như các tiêu chí này quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể.

7.2.2.2 Sử dụng hệ số thu hồi từ chất chuẩn

Nguyên tắc này sử dụng các chất chuẩn RM, CRM hoặc các CRM nội bộ để cung cấp huyền phù vi khuẩn có chứa một lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc đích đã biết hoặc các chủng không mong muốn. Hệ số thu hồi từ mè mới của môi trường nuôi cấy có thể được so sánh với số lượng cfu dự kiến từ RM, CRM hoặc RM nội bộ.

Có thể sử dụng chênh lệch tới hạn để tính giới hạn dung sai (xem TCVN 6910-6 (ISO 5725-6) [34]). Xem Bảng 1.

Đối với việc chuẩn bị và đánh giá các RM nội bộ, xem [21] và [29].

Chất lượng của RM phải được kiểm tra xác nhận trên môi trường đối chứng.

7.3 Thử nghiệm môi trường nuôi cấy sử dụng cho lọc màng

Chất lượng của các bộ lọc màng được sử dụng phải được đánh giá trước đó để chứng minh tính phù hợp của chúng về việc sử dụng, xem ISO 7704.

Để thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy sử dụng trong lọc màng, sử dụng giống làm việc và dịch cấy trong 5.4.2. Nuôi cấy môi trường huyền phù, ví dụ: chất lỏng pha loãng, nước vô trùng với mức dịch cấy thích hợp nêu trong 5.4.2.5.

Lọc chất lỏng theo các yêu cầu của tiêu chuẩn cụ thể. Đặt màng lọc lên bề mặt thạch cần thử. Nuôi cấy một lượng đủ các màng/dĩa để thu được khoảng 100 cfu cho thử nghiệm hiệu suất. Lặp lại với màng lọc mới và đặt màng thứ hai lên bề mặt môi trường đối chứng, sử dụng các độ pha loãng nếu cần cho phép thử tính chọn lọc. Nuôi ấm các đĩa theo tiêu chuẩn cụ thể.

Lặp lại quy trình mỗi lần khi thay đổi mẻ màng lọc mới cũng như mẻ môi trường mới.

Nếu cần, đánh giá ảnh hưởng của màng lọc đến kết quả sao cho dàn đều dịch cấy thử nghiệm lên môi trường thử nghiệm và môi trường đối chứng mà không có màng lọc.

7.4 Phương pháp thử định tính

7.4.1 Phương pháp cấy vạch định tính

7.4.1.1 Cách tiến hành

Sử dụng các giống làm việc và dịch cấy trong 5.4.2.

Đối với các phép thử hiệu suất và tính đặc hiệu, sử dụng đĩa môi trường thử nghiệm và cấy vạch từng vi sinh vật thử nghiệm sao cho thu được các khuẩn lạc mọc riêng rẽ.

Đối với các phép thử tính chọn lọc, sử dụng đĩa môi trường thử nghiệm và cấy vạch từng vi sinh vật thử nghiệm thành từng vạch thẳng sử dụng vòng cấy 1 µl lên bề mặt môi trường thử nghiệm. Vài vi sinh vật thử nghiệm có thể được cấy vạch trên cùng một đĩa thành các đường song song không giao nhau, các vạch cần phân biệt rõ để cho phép quan sát hình thái diễn hình. Có thể sử dụng các phương pháp cấy vạch đã chuẩn hóa khác.

Ü ấm các đĩa ở các điều kiện xác định trong các tiêu chuẩn cụ thể.

7.4.1.2 Diện giải các kết quả

Đánh giá sự phát triển trên các đĩa thạch sau khi ủ như sau:

- 0 tương ứng với không phát triển;
- 1 tương ứng với phát triển yếu;
- 2 tương ứng với phát triển tốt;

Các vi sinh vật đích phải bằng 2 và có vẽ bè ngoài, kích thước và hình thái của khuẩn lạc điển hình. Đối với các phép thử tính chọn lọc, mức độ ức chế phụ thuộc vào kiểu môi trường. Sự phát triển của các vi sinh vật không phải đích phải bị ức chế toàn phần hoặc một phần.

7.4.2 Xác định tính đặc hiệu

Định nghĩa về tính đặc hiệu được nêu trong 3.2.6. Tính đặc hiệu của môi trường nuôi cấy là chỉ thị về các đặc tính vật lý để phân biệt các vi sinh vật liên quan đến sự có mặt, không có mặt và/hoặc cấp độ thể hiện các phản ứng sinh hóa và kích thước khuẩn lạc và hình thái khuẩn lạc. Đối với các yêu cầu của giống làm việc và dịch cấy, xem 5.4.2.

7.4.3 Các phương pháp định tính khác đối với môi trường đặc

Có thể sử dụng các phương pháp định tính khác [9], [21].

8 Phương pháp thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy lỏng

8.1 Yêu cầu chung

Điều này mô tả các phương pháp định tính và định lượng để thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy lỏng. Sơ đồ tóm tắt cho từng phương pháp được nêu trong Phụ lục C.

8.2 Phương pháp định lượng trong ống nghiệm để thử hiệu năng của môi trường tăng sinh lỏng (phương pháp pha loãng để phân biệt)

8.2.1 Yêu cầu chung

Phương pháp này là phương pháp chung có thể được sử dụng đối với môi trường lỏng chọn lọc hoặc không chọn lọc. Phương pháp này cũng có thể thích hợp để thử hiệu năng của môi trường lỏng dùng để định lượng, ví dụ: trong các phương pháp đếm số có xác suất lớn nhất.

8.2.2 Chuẩn bị dãy pha loãng

- Chọn số ống đại diện, xem 6.3.1.

- Chuẩn bị các dãy pha loãng thích hợp từ giống làm việc của vi sinh vật đích hoặc không phải đích trong các dịch pha loãng quy định trong TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) và TCVN 9716 (ISO 8199) sao cho không có mặt các vi sinh vật trong dung dịch pha loãng nhất, ví dụ: từ 10^{-1} đến 10^{-10} . Thường sử dụng các dãy pha loãng thập phân, nhưng các độ pha loãng 1/5 hoặc 1/2 cũng thích hợp.
- Sử dụng các dãy pha loãng trong khoảng thời gian quy định, xem 5.4.2.3.
- Tại thời điểm sử dụng, chuyển một lượng đã biết, ví dụ: 0,1 ml mỗi dung dịch pha loãng sang bề mặt của đĩa thạch môi trường không chọn lọc và dàn đều.
- Ủ ấm trong các điều kiện thích hợp đối với vi sinh vật liên quan.
- Đếm số khuẩn lạc trên các đĩa thạch ở nồng độ pha loãng thấp nhất có chứa đến 150 khuẩn lạc và số khuẩn lạc có độ pha loãng cao hơn độ pha loãng này và ghi lại kết quả.

8.2.3 Quy trình thử nghiệm môi trường lỏng

- Chọn số lượng ống môi trường cần thử tương ứng với số ống trong dãy pha loãng.
- Sử dụng các dung dịch pha loãng đã chuẩn bị theo 8.2.2 và bắt đầu với dung dịch pha loãng nhất, nuôi cấy một lượng đã biết của huyền phù vi sinh vật thử nghiệm, ví dụ: 0,1 ml vào ống môi trường tương ứng.
- Ủ ấm các ống thử nghiệm trong các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn liên quan, xem 5.4.2.6.
- Sau khi ủ ấm, sử dụng vòng cấy riêng rẽ 10 µl cho mỗi ống môi trường đã ủ ấm để cấy chuyển sang môi trường thạch không chọn lọc.
- Ủ ấm các đĩa đã cấy ở các điều kiện thích hợp đối với vi sinh vật.
- Sau khi ủ ấm, kiểm tra từng đĩa về sự phát triển hoặc không phát triển của vi sinh vật.

CHÚ THÍCH: Đối với vi sinh vật đích, thường sử dụng các dung dịch pha loãng từ 10^{-5} đến 10^{-8} . Đối với các vi sinh vật không phải đích, thường sử dụng các dung dịch pha loãng từ 10^{-1} đến 10^{-4} .

8.2.4 Tính và diễn giải kết quả

Hiệu suất của môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc được đáp ứng nếu có phát triển tốt (ít nhất 10 cfu từ vòng cấy đày 10 µl) của vi sinh vật đích thu được từ dung dịch pha loãng tạo ra ít hơn 100 cfu (trong 0,1 ml) trên đĩa.

Đối với môi trường lỏng chọn lọc, xác định hệ số chọn lọc S_F , từ dung dịch pha loãng nhất của giống làm việc cho thấy phát triển tốt (ít nhất 10 cfu) trên đĩa thạch và dung dịch pha loãng nhất của môi trường lỏng chọn lọc cho thấy không phát triển (hoặc ít hơn 10 cfu) của vi sinh vật không phải đích trên đĩa thạch không chọn lọc. Hệ số S_F ít nhất phải bằng 2.

CHÚ THÍCH: Các phương pháp bổ sung cho phép thử định lượng của môi trường lỏng dùng để đánh giá môi trường đang được nghiên cứu hoặc trong các nghiên cứu so sánh được nêu trong Phụ lục I.

8.3 Phương pháp định tính trong ống nghiệm để thử hiệu năng của môi trường lỏng chọn lọc

8.3.1 Yêu cầu chung

Phương pháp này sử dụng vi sinh vật đích, không phải đích hoặc hỗn hợp vi sinh vật đích và không phải đích trong cùng ống nghiệm.

8.3.2 Cách tiến hành

- Chọn một lượng các ống, mỗi ống chứa 10 ml môi trường hoặc các phần 10 ml của mỗi mẻ cần thử nghiệm (xem 3.1.2 và 6.3.1). Tiến hành tiếp theo mô tả sau đây theo các yêu cầu quy định trong các Phụ lục E và Phụ lục F.
- Chuẩn bị dịch cấy: xem 5.4.2.3.
- Nuôi cấy các vi sinh vật đích: Nuôi cấy một ống canh thang thử nghiệm bằng cách cho một lượng dịch cấy chứa ≤ 100 cfu vi sinh vật đích rồi trộn.
- Nuôi cấy các vi sinh vật không phải đích: Nuôi cấy một ống canh thang thử nghiệm của một vi sinh vật bằng cách cho một lượng dịch cấy chứa lượng vi sinh vật cao hơn (> 1000 cfu) rồi trộn.
- Nuôi cấy các vi sinh vật đích và không phải đích trong cùng ống nghiệm khi yêu cầu trong Phụ lục E và Phụ lục F hoặc khi đánh giá môi trường mới hoặc đánh giá nhà sản xuất mới. Nuôi cấy một ống canh thang chứa ≤ 100 tế bào vi sinh vật đích và một lượng lớn hơn các vi sinh vật không phải đích (> 1 000 tế bào cho mỗi ống) trong cùng ống nghiệm và trộn.
- Ủ ấm các ống nghiệm ở các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn cụ thể, xem 5.4.2.6.
- Lấy một vòng cấy (10 µl) từ ống nghiệm chứa vi sinh vật đích và cấy vạch lên đĩa môi trường không chọn lọc (ví dụ: TSA).
- Nếu sử dụng hỗn hợp môi trường nuôi cấy vi sinh vật đích và không phải đích thì lấy một vòng cấy (10 µl) và cấy vạch lên đĩa môi trường xác định đối với vi sinh vật đích.
- Lấy một vòng cấy (10 µl) từ giống vi sinh vật không phải đích và cấy vạch lên đĩa môi trường chọn lọc (ví dụ: XLD).
- Ủ ấm các đĩa đã cấy ở các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn cụ thể.

Nếu sử dụng thể tích môi trường lớn hơn thì người sử dụng có thể chọn cách để chỉnh tỷ lệ dịch cấy sao cho thu được các kết quả tương đương.

8.3.3 Tính và diễn giải kết quả

Hiệu suất của canh thang thử nghiệm lỏng là đáp ứng nếu có phát triển tốt (ít nhất 10 cfu hoặc đường cấy phát triển tốt) của vi sinh vật đích thu được trên môi trường đặc thù đối với vi sinh vật đó.

Tính chọn lọc của canh thang thử nghiệm được đáp ứng nếu không có sự phát triển (hoặc ít hơn 10 cfu) của vi sinh vật không phải trên môi trường thạch không chọn lọc.

8.4 Phương pháp định tính trong ống nghiệm đơn (độ đục) để thử hiệu năng của môi trường lỏng

8.4.1 Yêu cầu chung

Phương pháp này thích hợp để thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy lỏng không chọn lọc và môi trường chọn lọc để thử khẳng định, ví dụ canh thang lactose mật lục sáng (BGBLB) [41]. Phương pháp này chỉ định tính và kết quả chỉ là chỉ thị. Môi trường đục chỉ có thể được thử nghiệm bằng phương pháp này nếu được cấy chuyển sang môi trường đặc cho thấy có phát triển.

Đối với các môi trường trong, đánh giá như sau:

- 0 tương ứng với không đục;
- 1 tương ứng với hơi đục;
- 2 tương ứng với khá đục;

8.4.2 Cách tiến hành

8.4.2.1 Môi trường tăng sinh sơ bộ

- Chọn một số ống, mỗi ống chứa 10 ml môi trường hoặc các phần 10 ml của mỗi mè cần thử nghiệm (xem 3.1.2 và 6.3.1).
- Đồi với phép thử hiệu năng của môi trường tăng sinh sơ bộ; ví dụ: nước đệm pepton (BPW), nuôi cấy môi trường với một lượng dịch cấy thích hợp (xem tiêu chuẩn cụ thể) có chứa ≤ 100 cfu trực tiếp vào môi trường thử nghiệm.
- Chuẩn bị dịch cấy: xem 5.4.2.3.
- Ủ ấm các ống trong các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn cụ thể, xem 5.4.2.6.
- Kiểm tra môi trường về sự phát triển.

8.4.2.2 Môi trường khẳng định

- Đồi với phép thử hiệu năng của môi trường khẳng định dạng lỏng, nuôi cấy môi trường thử nghiệm với huyền phù giống làm việc (có chứa > 10^6 cfu/ml) sử dụng vòng cấy 1 μl .

- Ủ ám ống nghiệm ở các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn cụ thể, xem 5.4.2.6.
- Nếu môi trường chưa nuôi cấy bị đục thì cấy chuyển sang môi trường đặc, ủ ám các đĩa ở các điều kiện quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể và kiểm tra sự phát triển.

8.4.3 Tính và diễn giải kết quả

Thực hiện đánh giá định tính trực quan bằng cách quan sát độ đục (nghĩa là 2) cho thấy phát triển tốt, xem 8.4.1. Đánh giá định tính môi trường mờ đục là chỉ thị có sự phát triển trên môi trường đặc.

CHÚ THÍCH 1: Đôi khi sự phát triển của vi sinh vật có thể quan sát được khi có ngưng kết tảng ở đáy ống nghiệm hoặc chai. Trong trường hợp này, lắc cẩn thận thi có thể cải thiện việc đánh giá và giải thích kết quả.

CHÚ THÍCH 2: Các đặc tính khác, như sinh khí và đổi màu cũng có thể đánh giá bằng phương pháp này.

9 Phương pháp thử hiệu năng của chất pha loãng và môi trường vận chuyển

9.1 Yêu cầu chung

Các phép thử hiệu năng vi sinh vật phải được thực hiện trên mẫu đại diện cho mè sản phẩm cuối cùng, xem 6.3.1.

9.2 Phương pháp thử nghiệm dịch pha loãng

9.2.1 Phương pháp thử định lượng dịch pha loãng

9.2.1.1 Yêu cầu chung

Phương pháp xác định hiệu năng của dịch pha loãng để duy trì sự sống của các vi sinh vật mà không có sự tăng hoặc giảm quá mức vi sinh vật trong suốt quá trình tiếp xúc trước khi đổ thạch lên đĩa hoặc nuôi cấy trong môi trường lỏng.

9.2.1.2 Cách tiến hành

Nuôi cấy phần thử nghiệm (ví dụ 9 ml) dịch pha loãng với 1 ml huyền phủ vi sinh vật chứa khoảng 10^4 cfu/ml và trộn, để chuẩn bị dịch cấy, xem 5.4.2. Lấy ngay 0,1 ml dịch đã cấy và dàn đều trên bề mặt thạch không lọc (môi trường đối chứng) như TSA (t_0).

Giữ dịch nuôi cấy ở nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian quy định trong phần thích hợp của bộ TCVN 6507 (ISO 6887) hoặc TCVN 9716 (ISO 8199) tính từ thời điểm kết thúc chuẩn bị huyền phủ ban đầu đến khi lấy dịch cấy ra cho tiếp xúc với môi trường nuôi cấy (thường là 45 min). Trộn và lấy ra một lượng tương tự (0,1 ml) và cấy đĩa lại trên môi trường đối chứng (t_1).

Ủ ám môi trường đối chứng ở nhiệt độ và thời gian thích hợp, ví dụ: 30 °C/72 h.

9.2.1.3 Đọc và diễn giải kết quả

Sau khi ủ ấm, đếm các khuẩn lạc trên các đĩa t_0 và t_1 .

Số lượng vi sinh vật, t_1 , sau khi ủ ấm dịch pha loãng đã cấy phải trong phạm vi $\pm 30\%$ số đếm ban đầu (t_0).

9.3 Phương pháp thử môi trường vận chuyển

9.3.1 Yêu cầu chung

Phương pháp xác định hiệu năng của môi trường vận chuyển để duy trì sự sống của các vi sinh vật trong quá trình vận chuyển mà không làm tăng hoặc giảm mức vi sinh vật đã cấy.

Nếu các hệ thống vận chuyển phù hợp với thiết bị lấy mẫu, thì phải được sử dụng để cấy môi trường vận chuyển. Mặt khác, việc nuôi cấy phải được thực hiện trong các điều kiện tương ứng với các điều kiện thực tế.

Ủ ấm môi trường vận chuyển đã cấy ở nhiệt độ và thời gian thích hợp theo thực tế hoặc nêu quy định trong tiêu chuẩn cụ thể [12], [13].

Ví dụ: Các hệ thống vận chuyển để vận chuyển mẫu trong các điều kiện lạnh được thử nghiệm ở nhiệt độ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ đối với quá trình vận chuyển thông thường, ví dụ: 24 h trước khi lặp lại đỗ đĩa.

9.3.2 Phương pháp thử định lượng môi trường vận chuyển lỏng

9.3.2.1 Cách tiến hành

Nuôi cấy phần mẫu thử (ví dụ 10 ml) môi trường vận chuyển lỏng với một lượng vi sinh vật thử nghiệm thích hợp cần sử dụng. Sử dụng mức dịch cấy chứa khoảng 10^3 đến 10^4 tế bào cho mỗi ống 10 ml, để chuẩn bị dịch cấy, xem 5.4.2. Lấy ngay 0,1 ml môi trường đã cấy và dàn đều trên bề mặt thạch không chọn lọc (môi trường đối chứng) như TSA (t_0).

Để nuôi cấy trong các hệ thống vận chuyển bằng các dụng cụ lấy mẫu, đặt dụng cụ lấy mẫu trong một lượng dung dịch giống làm việc thích hợp (ví dụ 0,1 ml đối với tăm bông) (chứa khoảng 10^3 đến 10^4 tế bào) trong khoảng 10 s, sau đó nuôi cấy môi trường vận chuyển bằng dụng cụ lấy mẫu. Lấy ngay 0,1 ml môi trường vận chuyển lỏng đã cấy và dàn đều trên bề mặt thạch không chọn lọc (môi trường đối chứng) như TSA (t_1).

Ủ ấm môi trường vận chuyển đã cấy ở nhiệt độ và thời gian thích hợp theo thực tế hoặc nêu trong tiêu chuẩn cụ thể, ví dụ: $25^{\circ}\text{C}/5$ ngày đối với môi trường vận chuyển và $30^{\circ}\text{C}/3$ ngày đối với môi trường đối chứng, sau đó lặp lại việc đỗ đĩa trên môi trường đối chứng (t_1).

9.3.2.2 Đọc và diễn giải kết quả

Sau khi ủ ấm, đếm các khuẩn lạc trên các đĩa t_0 và t_1 .

Số lượng vi sinh vật, t_1 , sau khi ủ ấm môi trường vận chuyển phải trong phạm vi $\pm 30\%$ số đếm ban đầu (t_0).

9.3.3 Phương pháp thử định tính môi trường vận chuyển rắn

9.3.3.1 Cách tiến hành

Nuôi cấy phần mẫu thử (ví dụ 10 ml) môi trường vận chuyển rắn với một lượng vi sinh vật thử nghiệm thích hợp cần sử dụng. Sử dụng mức dịch cấy chứa khoảng 10^4 đến 10^6 , để chuẩn bị dịch cấy, xem 5.4.2

Để nuôi cấy các hệ thống vận chuyển bằng các dụng cụ lấy mẫu, đặt dụng cụ lấy mẫu trong một lượng dung dịch giống làm việc thích hợp (ví dụ 100 µl đối với tăm bông) (chứa khoảng 10^4 đến 10^6 tế bào) trong khoảng 10 s, sau đó nuôi cấy môi trường vận chuyển bằng dụng cụ lấy mẫu.

Ủ ấm môi trường vận chuyển đã nuôi cấy ở nhiệt độ và thời gian thích hợp theo thực tế hoặc nêu trong tiêu chuẩn quy định cụ thể. Cấy chuyền lên môi trường thạch không chọn lọc (môi trường đối chung), như thạch TSA và ủ ấm theo thực tế hoặc nêu trong tiêu chuẩn cụ thể.

9.3.3.2 Đọc và giải thích kết quả

Sau khi ủ ấm, kiểm tra sự phát triển của khuẩn lạc trên thạch không chọn lọc.

Phải quan sát thấy sự phát triển của các vi sinh vật sau khi ủ ấm.

10 Hệ thống tài liệu về các kết quả thử nghiệm

10.1 Thông tin từ nhà sản xuất

Nhà sản xuất hoặc nhà cung cấp môi trường nuôi cấy phải cung cấp, khi có yêu cầu, về các đặc tính phát triển của vi sinh vật cụ thể và các thông tin chung liên quan đến mẻ môi trường nuôi cấy cụ thể.

10.2 Truy xuất nguồn gốc

Tất cả các số liệu từ phép thử hiệu năng thông thường cần được lập văn bản theo cách thích hợp và được giữ trong khoảng thời gian thích hợp theo hệ thống chất lượng được sử dụng. Cần sử dụng các biểu mẫu kiểm soát đối với tài liệu và biểu mẫu để đánh giá các kết quả thử nghiệm (xem Phụ lục D).

Phụ lục A
(Tham khảo)

**Tên gọi các thành phần môi trường nuôi cấy sử dụng trong phân tích
vi sinh vật thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và nước**

A.1 Yêu cầu chung

Các tên gọi sau đây đã được thống nhất để hài hòa tên gọi của các thành phần khác nhau của môi trường nuôi cấy trong các tiêu chuẩn phương pháp phân tích vi sinh vật.

A.2 Pepton

- Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym;

CHÚ THÍCH 1: Sản phẩm này bao gồm cả sản phẩm thủy phân casein bằng chất phân hủy tuyến tụy hoặc pepsin, sản phẩm thủy phân casein và trypton bằng trypsin.

- Sản phẩm thủy phân đậu tương hoặc bột đậu tương bằng enzym;
- Sản phẩm thủy phân mô động vật bằng enzym;

CHÚ THÍCH 2: Sản phẩm này bao gồm cả pepton thịt, sản phẩm thủy phân thịt bằng pepsin, sản phẩm thủy phân thịt bằng chất phân hủy tuyến tụy.

- Sản phẩm thủy phân tim bằng enzym;
- Sản phẩm thủy phân gelatin bằng enzym;
- Sản phẩm thủy phân mô động vật và thực vật bằng enzym;

CHÚ THÍCH 3: Sản phẩm này bao gồm cả trypton.

- Sản phẩm thủy phân casein bằng axit.

A.3 Các chất chiết và chất đẽ pha

- Chất chiết thịt và canh thang thịt;
- Chất chiết tim-não và canh thang tim-não;
- Chất chiết nấm men.

A.4 Thạch

Thạch dùng cho vi khuẩn.

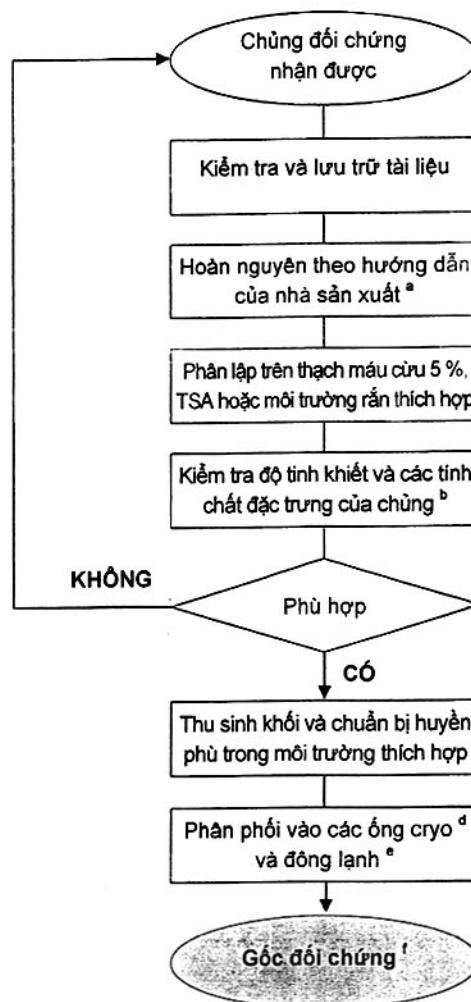
A.5 Các loại khác

- Nhũ tương lòng đỏ trứng;
- Sữa bột già;
- Huyết, huyết đã tách fibrin hoặc huyết đã dung giải, bột máu, plasma, sợi huyết, haemin từ các động vật xác định;
- Mật bò dùng cho vi khuẩn;
- Các muối mật.

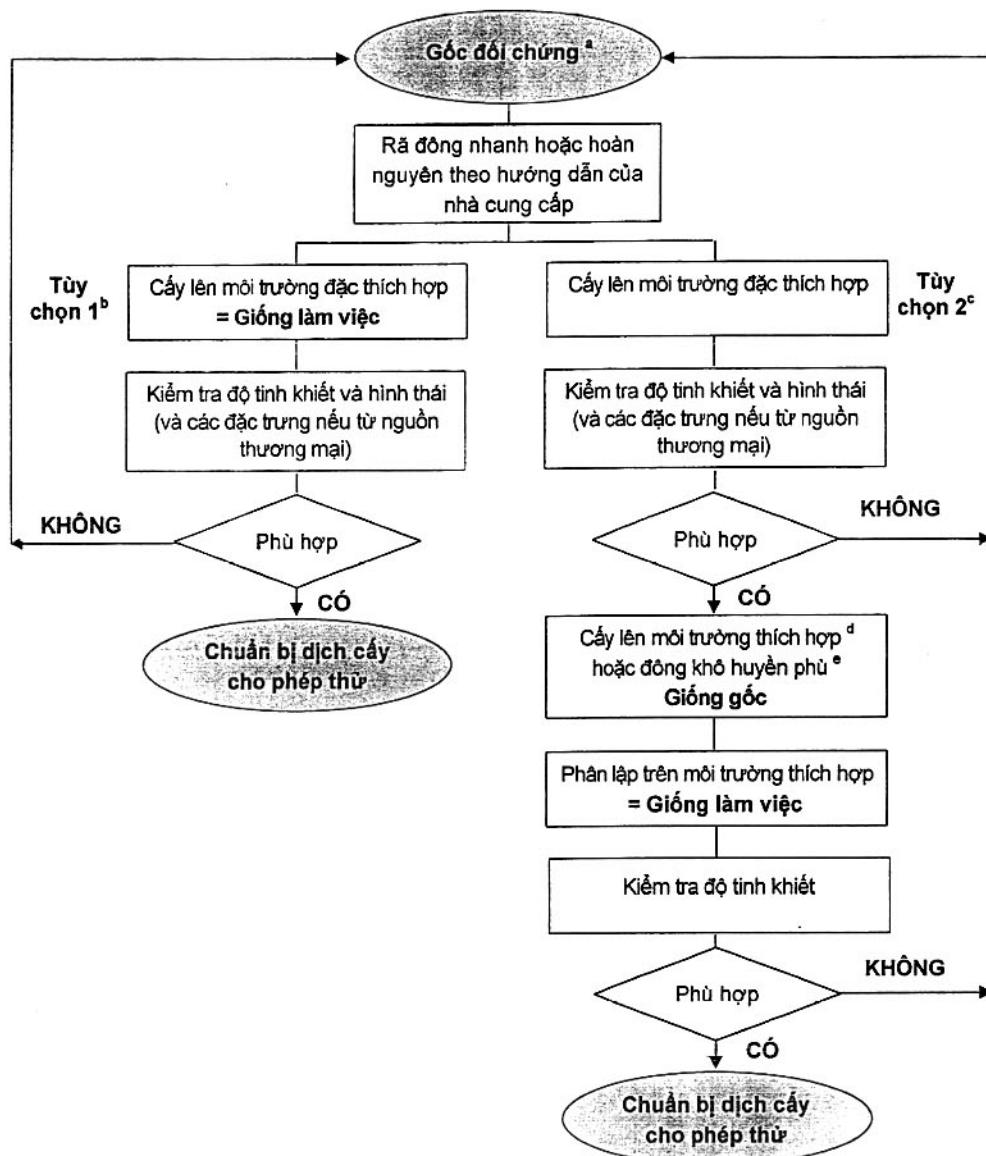
CHÚ THÍCH: Các loại này bao gồm các muối mật số 3.

Phụ lục B

(Quy định)

Chuẩn bị gốc đối chứng và giống làm việc**B.1 Chuẩn bị gốc đối chứng từ chủng đối chứng**^a Nhìn chung, hoàn nguyên trong canh thang dinh dưỡng và cần thời gian để hồi phục.^b Kiểm tra xác nhận hình thái các khuẩn lạc và nhuộm Gram hoặc nhận biết sử dụng phép thử sinh hóa.^c Ví dụ môi trường bảo vệ cryo, như TSB được bổ sung từ 10 % glycerol đến 15 % glycerol (thể tích).^d Các ống cryo có thể chứa các hạt.^e Làm đông lạnh ở nhiệt độ dưới – 70 °C có thể kéo dài thời gian bảo quản. Nên hạn chế thời gian bảo quản ở nhiệt độ cao hơn [36].^f Có thể sử dụng trực tiếp giống làm việc.**Hình B.1 – Sơ đồ chuẩn bị gốc đối chứng từ chủng đối chứng**

B.2 Chuẩn bị giống làm việc từ chủng đối chứng



^a Kiểm tra các tài liệu, kě cả liên kết đến chủng đối chứng và các đặc tính liên quan, nếu gốc đối chứng thu được từ nguồn khác.

^b Quy trình này là thích hợp.

^c Quy trình này có thể cần thiết đối với một vài chủng, ví dụ: cho các phép định lượng. Mọi giai đoạn phải được ghi lại.

^d Ví dụ: nuôi cây trên thạch nghiêng TSA hoặc TSA huyết cùu hoặc môi trường thích hợp khác, ủ ấm 24 h và bảo quản ở nhiệt độ thích hợp (18 °C đến 25 °C hoặc 2 °C đến 8 °C tùy thuộc vào vi sinh vật) đến 4 tuần [36].

^e Ví dụ môi trường bảo vệ cryo, như TSB được bổ sung từ 10 % glycerol đến 15 % glycerol (thể tích). Làm đông lạnh ở nhiệt độ dưới -70 °C có thể kéo dài thời gian bảo quản. Nên hạn chế thời gian bảo quản ở nhiệt độ cao hơn [36].

Hình B.2 – Sơ đồ chuẩn bị giống làm việc từ gốc đối chứng

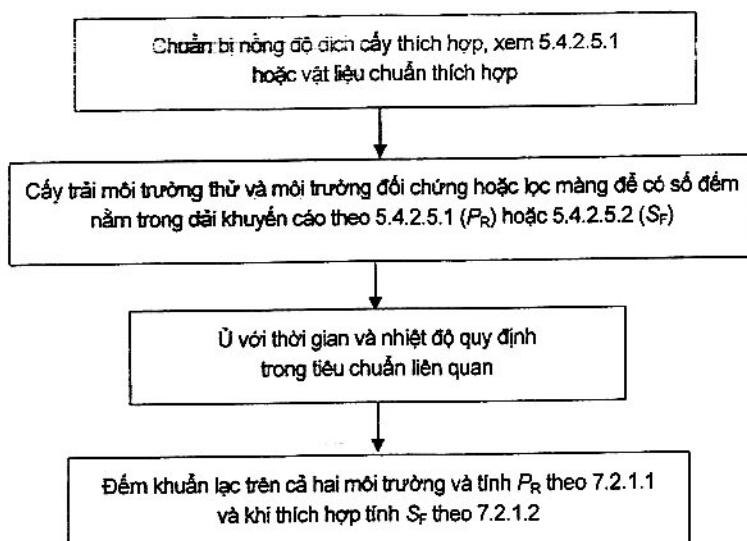
Phụ lục C
(Quy định)

Sơ đồ của các phương pháp thử hiệu năng

C.1 Yêu cầu chung

Xem Điều 7.

C.2 Phương pháp định lượng đối với môi trường đặc: hiệu suất và tính chọn lọc
(xem 7.2.2 và Hình C.1).



CHÚ ĐÁN

P_R Hệ số hiệu suất.

S_F Hệ số chọn lọc.

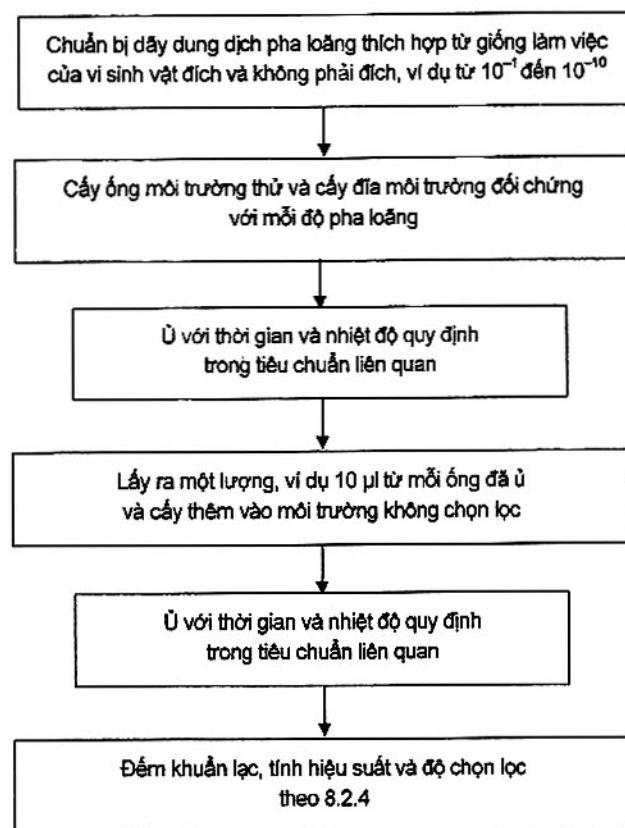
Hệ số hiệu suất P_R có thể được dùng để so sánh:

- môi trường không chọn lọc với môi trường đối chứng không chọn lọc.
- môi trường chọn lọc với môi trường đối chứng không chọn lọc.
- môi trường chọn lọc với môi trường đối chứng chọn lọc.

Để ủ ấm (hộp thứ ba của Hình này), xem 5.4.2.6.

Hình C.1 – Sơ đồ phép thử định lượng môi trường nuôi cây đặc

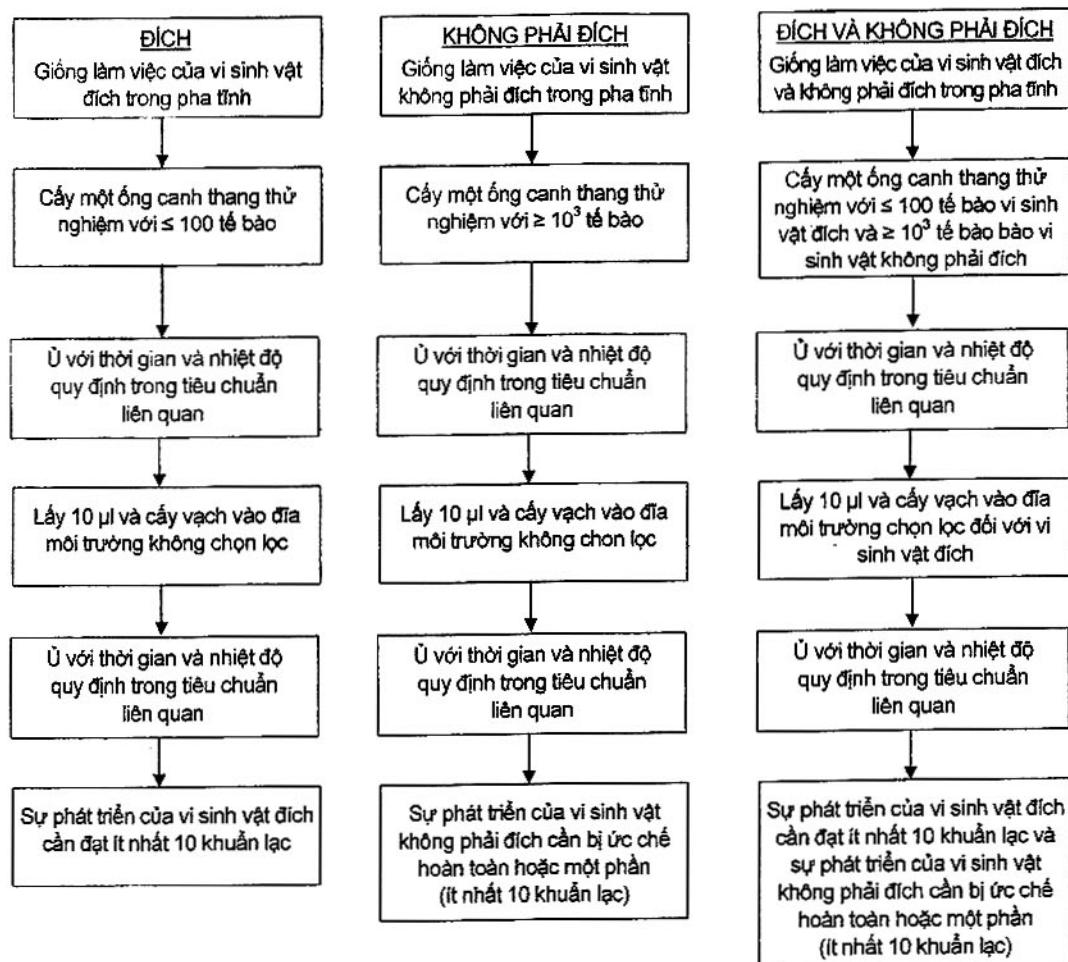
C.3 Phương pháp định lượng trong ống nghiệm để thử hiệu năng của môi trường tăng sinh lỏng (xem 8.2 và Hình C.2)



CHÚ THÍCH: Để ủ ấm (hộp thứ năm của hình này), xem 5.4.2.6.

**Hình C.2 – Sơ đồ phép thử hiệu năng môi trường tăng sinh lỏng
(phương pháp độ pha loãng giảm dần)**

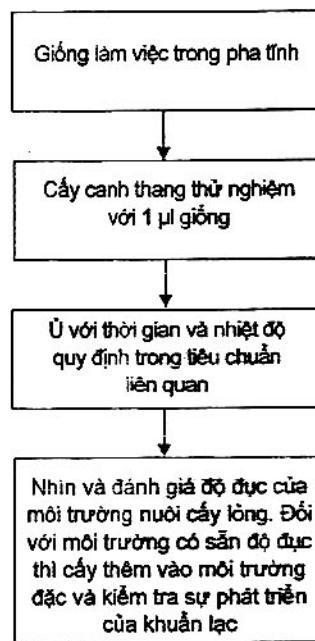
C.4 Phương pháp định tính trong ống nghiệm đơn đối với môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc (với vi sinh vật đích, không phải đích, hoặc hỗn hợp của vi sinh vật đích và không phải đích trong cùng một ống) (xem 8.3 và Hình C.3)



CHÚ THÍCH: Để ü ám (hộp thử nấm của mỗi cột trong hình này), xem 5.4.2.6.

Hình C.3 – Sơ đồ của phương pháp định tính trong ống nghiệm đơn đối với môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc

C.5 Phương pháp định tính trong ống nghiệm đơn đối với môi trường không chọn lọc và môi trường lỏng chọn lọc: Độ đục (xem 8.4 và Hình C.4)



Nhìn chung, cần kiểm tra các đặc tính phát triển vi khuẩn đối với từng môi trường lỏng, ví dụ: sinh khí, đổi màu, nếu có thể.

CHÚ THÍCH: Để ủ ấm (hộp thứ ba của hình này), xem 5.4.2.6.

Hình C.4 – Sơ đồ thử định tính môi trường lỏng trong ống nghiệm đơn (độ đục)

Phụ lục D

(Tham khảo)

Ví dụ về phiếu ghi các kết quả thử nghiệm môi trường nuôi cây

Bảng D.1 – Ví dụ về phiếu

Phiếu kiểm soát thử nghiệm chất lượng nội bộ của môi trường nuôi cây				
Môi trường nuôi cây	Lượng được chuẩn bị	Ngày rót	Số mẻ nội bộ	
Môi trường khô (và mã số):	Người cung cấp	Mè	Lượng:	Ngày/chữ ký
Chất bổ sung	Người cung cấp	Mè	Lượng:	Ngày/chữ ký
Chi tiết quy trình:				
Kiểm soát chất lượng vật lý				
Vẽ bén ngoài dự kiến của môi trường nuôi cây khô	Màu bình thường, không bị chảy	Chất lượng được khẳng định: Có: Không:	Các khuyết tật:	Ngày/chữ ký
Giá trị pH dự kiến:	pH đo được:	Chất lượng được khẳng định: Có: Không:	Các khuyết tật:	Ngày/chữ ký
Lượng điện đầy và/hoặc độ dày dự kiến	Quan sát được:	Chất lượng được khẳng định: Có: Không:	Các khuyết tật:	Ngày/chữ ký
Màu sắc dự kiến	Quan sát được:	Chất lượng được khẳng định: Có: Không:	Các khuyết tật:	Ngày/chữ ký
Độ nét/sự có mặt của các vật phát quang dự kiến	Quan sát được:	Chất lượng được khẳng định: Có: Không:	Các khuyết tật:	Ngày/chữ ký
Độ ồn định gel/độ đặc/độ ẩm	Quan sát được:	Chất lượng được khẳng định: Có: Không:	Các khuyết tật:	Ngày/chữ ký
Nhiễm khuẩn				
Số lượng đĩa hoặc ống được thử nghiệm: Ü ấm:	Kết quả	Chất lượng được khẳng định: Có: Không:	Số lượng đĩa hoặc ống bị nhiễm:	Ngày/chữ ký
Phát triển vi khuẩn – Hiệu suất		Phương pháp kiểm chứng: Định lượng: Định tính:		
Chủng Ü ấm: Môi trường đối chứng:	Tiêu chí:	Kết quả:	Chất lượng được khẳng định: Có: Không:	Ngày/chữ ký
Phát triển vi khuẩn – Tính chọn lọc		Phương pháp kiểm soát: Định lượng: Định tính:		
Chủng Ü ấm: Môi trường đối chứng:	Tiêu chí:	Kết quả:	Chất lượng được khẳng định: Có: Không:	Ngày/chữ ký
Phát triển vi khuẩn – Tính đặc hiệu		Phương pháp kiểm chứng: Định lượng: Định tính:		
Chủng Ü ấm: Môi trường đối chứng:	Tiêu chí:	Kết quả:	Chất lượng được khẳng định: Có: Không:	Ngày/chữ ký
Đánh giá mè môi trường				
Chi tiết bảo quản:	Biên lai của mè hàng: có: không:			Ngày/chữ ký

Phụ lục E

(Quy định)

**Các vi sinh vật thử nghiệm và các tiêu chí hiệu năng đối với môi trường
nuôi cấy khuẫn lạc được sử dụng cho vi sinh vật trong thực phẩm**

Phụ lục này cung cấp thông tin về môi trường nuôi cấy, các điều kiện nuôi cấy, các vi sinh vật thử nghiệm, số bộ sưu tập giống vi sinh vật thử nghiệm và các phản ứng dự kiến khi thực hiện thử nghiệm môi trường nuôi cấy.

Các chủng đặc thù được chọn để thử nghiệm nhằm đảm bảo sự nhất quán giữa các phòng thử nghiệm và để chứng minh sự khác nhau giữa các môi trường (giữa các mě, giữa các nhà sản xuất). Các chủng này đã được đánh giá đầy đủ để đảm bảo sự phù hợp và thống nhất về hiệu năng.

Khi có nhiều hơn một chủng được liệt kê cho mỗi lĩnh vực thử hiệu năng (hiệu suất, tính chọn lọc, tính đặc hiệu), thì ít nhất các chủng được sử dụng phải được viết rõ bằng chữ b. Các nhà cung cấp môi trường thương mại hoặc phi thương mại dự kiến sử dụng các chủng bổ sung, ví dụ: các chủng nêu trong Bảng E.1 để đảm bảo thêm về chất lượng của môi trường nuôi cấy mà họ áp dụng.

Bảng E.1 được thiết lập có tính đến các chủng kiểm soát được sử dụng trong Dược điển châu Âu (EP) và các khuyến nghị đối với môi trường nuôi cấy vi sinh vật trong thực phẩm từ Nhóm làm việc của Ủy ban quốc tế về Ví sinh vật thực phẩm và Vệ sinh thực phẩm (ICFMH). Các tiêu chí này phải được đưa vào trong các tiêu chuẩn cụ thể khi được xây dựng và soát xét. Mě môi trường nuôi cấy đã được đánh giá xác nhận là mě môi trường đáp ứng được hiệu năng. Số lượng chủng được quy định trong Bảng E.1 là số lượng từ bảng kê của các bộ định danh chủng phổ biến do Trung tâm Dữ liệu Thế giới về Ví sinh vật (WDCM) cung cấp.^[20] Bảng kê này có chứa chi tiết các chủng đối chứng được thể hiện bằng mỗi số WDCM và các chi tiết liên lạc của các bộ sưu tập giống. Tất cả các môi trường trích dẫn được quy định trong các tiêu chuẩn quốc tế (ISO) và tiêu chuẩn quốc gia (TCVN).

Nếu gặp phải sự biến đổi về chủng thì nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy (ví dụ: thu lầy cùng môi trường từ các nhà sản xuất khác nhau), thu lầy giống đối chứng bổ sung từ bộ sưu tập giống gốc. Người sử dụng phải phản hồi về sự biến đổi về chủng cho WG5 Môi trường nuôi cấy của ISO/TC34/SC9.

Các chú thích được sử dụng trong Bảng E.1 như sau:

- a Tên gọi đầy đủ của các thuật ngữ môi trường viết tắt nêu trong Bảng E.2.
- b Các chủng được sử dụng ít nhất;
- c Tham khảo đến bảng kê chủng đối chứng có sẵn trên <http://www.wfcc.info> về thông tin số lượng chủng của bộ sưu tập giống và các chi tiết liên lạc.
- d Chủng được chọn tự do, một trong các chủng được sử dụng ít nhất.
- e L: môi trường lỏng; S: môi trường đặc; SS: môi trường bán đặc
- f Phát triển/độ đục được phân loại như sau: 0 – không phát triển/không đục; 1 – phát triển yếu/hơi đục và 2 – phát triển/có đục (xem 7.4.2.1, 8.4.1).
- g *Escherichia coli* WDCM 00013 được nêu trong tiêu chuẩn cụ thể.
- h *Escherichia coli* WDCM 00013 là chất sản xuất ra β-d-gluconidase mạnh và WDCM 00202 chất sản xuất ra β-d-gluconidase yếu.
- i Một số quy định và hạn chế của quốc gia về sử dụng typ huyết thanh khác. Xem các yêu cầu hiện hành về việc chọn typ huyết thanh *Salmonella*.
- j Trong trường hợp sử dụng phép thử định tính và định lượng đối với môi trường thì chỉ cần các kết quả định lượng (xem Bảng E.1).
- k Các chi tiết về kiểm soát chất lượng môi trường MSRV kể cả nồng độ cuối cùng của dịch cấy và các tiêu chí được nêu trong TCVN 4829 (ISO 6579).
- l Nếu môi trường dinh dưỡng được sử dụng cho hai hoặc ba ứng dụng khác nhau: ít nhất là thực hiện phép thử phát triển *Salmonella* (nếu phòng thử nghiệm thực hiện thử vi sinh vật này).
- m Nếu môi trường BPW được sử dụng cho hai hoặc ba ứng dụng khác nhau: ít nhất là thực hiện phép thử phát triển *Salmonella* (nếu phòng thử nghiệm thực hiện thử vi sinh vật này).
- n Chọn các chủng theo phương pháp sử dụng trong đó TSA được dùng làm môi trường đối chứng.

Bảng E.1 – Các vi sinh vật thử nghiệm và các tiêu chí hiệu năng của môi trường nuôi cấy thường dùng trong vi sinh vật thực phẩm

Môi trường ^a	Typ	Vi sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ú	Chủng đối chứng	Số WDCMC	Môi trường đối chứng		Chuẩn cứ	Các phản ứng đặc trưng
								Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng		
Thạch Listeria theo Ottaviani và Agosti	S	<i>Listeria monocytogenes</i>	TCVN 7700-2 (ISO 11290-2)	Hiệu suất	(44 ± 4) h/ (37 ± 1) °C	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	00021 ^b	TSA	Định lượng	$P_R \geq 0,5$	Khuẩn lạc màu xanh lục lam có quặng đục
				Tính chọn lọc		<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	00109				
				Độ đặc hiệu		<i>Escherichia coli</i> ^d	00012 hoặc 00013		Định tính	Ức chế toàn phần (0)	
Baird -Parker	S	<i>Staphylococci</i> dương tính coagulase	TCVN 4830-1 (ISO 6888-1)	Hiệu suất	(24 ± 2) h đến (48 ± 2) h/ (37 ± 1) °C	<i>Staphylococcus aureus</i>	00034 ^b 00032	TSA	Định lượng	$P_R > 0,5$	Khuẩn lạc màu đen hoặc xám có quặng trong (phản ứng làm trong lòng đồ trứng)
				Tính chọn lọc		<i>E. coli</i> ^d	00012 00013		Định tính	Ức chế toàn phần (0)	
				Độ đặc hiệu		<i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	00159 ^c 00036		Định tính	-	Khuẩn lạc màu đen hoặc xám không có phản ứng làm trong lòng đồ trứng
BGBLB	L	Coliform	TCVN 4882 (ISO 4831)	Hiệu suất	(24 ± 2) h đến (48 ± 2) h/ (30 ± 1) °C	<i>E. coli</i>	00012 ^b 00013	Định tính	Đục (2) ^f và có khí trong ống Durham	Có sinh khí và có đục	-
				Độ đặc hiệu		<i>Citrobacter freundii</i>	00006				
						<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 00087	Định tính	Ức chế từng phần không sinh khí		

Bảng E.1 (tiếp theo)

CFC	S	<i>Pseudomonas</i> spp.	TCVN 7138 (ISO 13720)	Hiệu suất	(44 ± 4) h/ (25 ± 1) °C	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	00115 ^b	TSA	Định lượng	$P_R \geq 0,5$	-
				Tinh chọn lọc		<i>Pseudomonas fragi</i>	00116				
DG18	S	Nấm men và nấm mốc	TCVN 8275-2 (ISO 21527-2)	Hiệu suất	5 ngày/ (25 ± 1) °C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00058 ^b	SDA	Định lượng	$P_R \geq 0,5$	Khuẩn lạc/chồi đặc trưng theo từng loài
				Tinh chọn lọc		<i>Wallechia sebi</i>	00182 ^b				
DRBC	S	Nấm men và nấm mốc	TCVN 8275-1 (ISO 21527-1)	Hiệu suất	5 ngày/ (25 ± 1) °C	<i>Aspergillus restrictus</i>	00183	SDA	Định lượng	$P_R \geq 0,5$	Khuẩn lạc/chồi đặc trưng theo từng loài
				Tinh chọn lọc		<i>Eurotium rubrum</i>	00184				
EC	L	<i>E. coli</i>	TCVN 6846 (ISO 7251)	Hiệu suất	(24 ± 2) h đến (48 ± 2) h/ (44 ± 1) °C	<i>E. coli</i>	00012 ^b	SDA	Định lượng	$P_R \geq 0,5$	Khuẩn lạc/chồi đặc trưng theo từng loài
				Tinh chọn lọc		<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	00013 ^g				
IS ("TS")	S	Vi khuẩn tạo sulfit	TCVN 7902 (ISO 15213)	Hiệu suất	(24 ± 3) h đến (48 ± 2) h/ (37 ± 1) °C môi trường kị khí	<i>Clostridium perfringens</i>	00007 ^b	TSA hoặc môi trường không chọn lọc khác đối với vi khuẩn kị khí	Định lượng	$P_R \geq 0,5$	Khuẩn lạc màu đen
				Tinh chọn lọc		<i>E. coli</i> ^d	00012 00013				

Bảng E.1 (tiếp theo)

LST	L	Coliform	TCVN 4882 (ISO 4831)	Hiệu suất	(24 ± 2) h đến (48 ± 2) h/ (30 ± 1) °C	<i>E. coli</i>	00012 ^b 00013	-	Định tính	Độ đục (2) ^f và khí trong ống Durham	màu đen		
				Tính chọn lọc		<i>Citrobacter freundii</i>	00006				Có sinh khí và có đục		
				<i>E. coli</i>		<i>Enterococcus faecalis^d</i>	00009 00087	-	Định tính	Không phát triển	-		
						<i>E. coli</i>	00012 ^b 00013				Có sinh khí và có đục		
mCCDA	S	Campylobacter	TCVN 7715-2 (ISO 10272-2)	Hiệu suất	(44 ± 4) h / (41.5 ± 1) °C môi trường hiếu khí	<i>Campylobacter jejuni^d</i>	00156 00005	Thạch máu	Định lượng	P _R ≥ 0,5	Khuẩn lạc màu xám nhạt, phẳng và ẩm, đôi khi có ánh màu kim loại		
				Tính chọn lọc		<i>Campylobacter coli^d</i>	00004						
				<i>E. coli^d</i>		<i>E. coli^d</i>	00012 hoặc 00013	-	Định tính	-			
						<i>Staphylococcus aureus</i>	00034						
MRS	S	Vi khuẩn sinh axit lactic	TCVN 7906 (ISO 15214)	Hiệu suất	(72 ± 3) h / (30 ± 1) °C	<i>Lactobacillus sakei</i>	00015 ^b	Mě môi trường MRS đã được đánh giá	Định lượng	P _R ≥ 0,7	Khuẩn lạc đặc trưng theo từng loài		
				Tính chọn lọc		<i>Lactococcus lactis</i>	00016 ^b						
				<i>E. coli^d</i>		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	00158	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0)			
						<i>Bacillus cereus</i>	00012 hoặc 00013 00001						
MYP	S	<i>Bacillus cereus</i>	TCVN 4992 (ISO 7932)	Hiệu suất	(24 ± 3) h đến (44 ± 4) h / (30 ± 1) °C	<i>Bacillus cereus</i>	000011	TSA	Định lượng	P _R ≥ 0,5	Khuẩn lạc màu hồng có quặng kết tủa		
				Tính chọn lọc		<i>E. coli^d</i>	00012 hoặc 00013						
				Độ đặc	(44 ± 4) h / (30 ± 1) °C	<i>Bacillus subtilis</i>	00003	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	Khuẩn lạc màu vàng		

Bảng E.1 (tiếp theo)

				hiệu		subsp. <i>spizizenii</i>					không có quặng kết tủa
RPFA	S	Staphylococci dương tính coagulase	TCVN 4830-2 (ISO 6888-2)	Hiệu suất	(24 ± 2) h đến (48 ± 2) h/ (37 ± 1) °C	<i>Staphylococcus aureus</i>	00034 ^b 00032	TAS	Định lượng	P _R ≥ 0,5	Khuẩn lạc màu đen hoặc xám có quặng mờ đục
				Tính chọn lọc	(48 ± 2) h/ (37 ± 1) °C	<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	-
				Độ đặc hiệu	(24 ± 2) h đến (48 ± 2) h/ (37 ± 1) °C	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	00159 ^b 00036	-	Định tính	-	Khuẩn lạc màu đen hoặc xám có quặng mờ đục
PPA	S	<i>Pseudomonas</i> spp.	TCVN 8899 (ISO/TS 11059)	Hiệu suất	48 ± 2) h/ (25 ± 1) °C	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	00115 ^b	TSA	Định lượng	P _R ≥ 0,5	-
				Tính chọn lọc		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00025		Định tính	Ức chế toàn phần (0)	-
					<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	-	
TBX	S	<i>E. coli</i> dương tính β-D-glucuronidase	TCVN 7924-1 (ISO 16649-1) và TCVN 7924-2 (ISO 16649-2)	Hiệu suất	(21 ± 3) h/ (44 ± 1) °C	<i>E. coli</i> ^b	00012 ^d 00013 ^d 00202 ^b	TSA	Định lượng	P _R ≥ 0,5	Khuẩn lạc màu xanh lam
				Tính chọn lọc		<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 00087		Định tính	Ức chế toàn phần (0)	-
				Độ đặc hiệu		<i>Citrobacter freundii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00006 ^b 00025		Định tính	-	Khuẩn lạc màu trắng đến xanh lục-xanh be
TSC (SC)	S	<i>Clostridium perfringens</i>	TCVN 4991 (ISO 7937)	Hiệu suất	(21 ± 2) h/ (37 ± 1) °C môi trường kị khí	<i>Clostridium perfringens</i>	00007 00080	TSA hoặc môi trường không chọn lọc khác đối với vi khuẩn kị khí	Định lượng	P _R ≥ 0,5	Khuẩn lạc màu đen
				Tính chọn lọc		<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013		Định tính	Ức chế toàn phần (0)	-
						<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00025				

Bảng E.1 (tiếp theo)

VRBG	S	<i>Enterobacteriaceae</i>	TCVN 5518-2 (ISO 21528-2)	Hiệu suất	(24 ± 2) h/ (37 ± 1) °C	<i>E. coli</i>	00012 ^b 00013	TSA	Định lượng	P _R ≥ 0,5	Khuẩn lạc màu hồng đen đỏ, có hoặc không có quặng kết tủa bên ngoài
						<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> ^{d,l} <i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i> ^{d,l}	00031 00030				
				Tính chọn lọc		<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> ^d	00009 00087	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	-	
VRBL	S	Coliform	TCVN 6848 (ISO 4832)	Hiệu suất	(24 ± 2) h/ (30 ± 1) °C	<i>E. coli</i>	00012 ^b 00013	TSA	Định lượng	P _R ≥ 0,5	Khuẩn lạc màu đỏ tía, có hoặc không có quặng kết tủa
						<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> ^d	00009 00087				
				Độ đặc hiệu		<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	00025				Khuẩn lạc không màu đen màu be
Môi trường không chọn lọc để đếm vi sinh vật											
Môi trường	Typ	Vị sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ú	Chủng đối chứng	Số WDCMc	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng	Chuẩn cứ	Các phản ứng đặc trưng
PCA MPCA	S	Đếm khuẩn lạc	ISO 4833	Hiệu suất	(72 ± 3) h/ (30 ± 1) °C	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	00003 ^b 00012 ^b 00013 00034	TSA	Định lượng	P _R ≥ 0,7	-
Môi trường tăng sinh chọn lọc											
Môi trường	Typ	Vị sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ú	Chủng đối chứng	Số WDCMc	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng	Chuẩn cứ	Các phản ứng đặc trưng
Bolton	L	<i>Campylobacter</i>	TCVN 7715-1 (ISO 10272-1)	Hiệu suất	(5 ± 1) h/ (37 ± 1) °C sau đó (44 ± 4) h/ (41,5 ± 1) °C môi trường hiếu khí	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> ^d <i>Campylobacter coli</i> + <i>E. Coli</i> ^d + <i>Proteus mirabilis</i>	000156 hoặc 00005 00004 00012 00013 00023	-	Định tính	>10 khuẩn lạc trên mCCDA	Khuẩn lạc màu xám nhạt, phẳng và ẩm đối khi có ánh màu kim loại
				Tính		<i>E. coli</i> ^d	00012 00013				

Bảng E.1 (tiếp theo)

				chọn lọc		<i>Proteus mirabilis</i>	00023			TSA		
EE	L	<i>Enterobacteriaceae</i>	TCVN 5518-1 (ISO 21528-1)	Hiệu suất	(24 ± 2) h/ (37 ± 1) °C	<i>E. coli</i>	00012 ^b 00013	-	Định tính	>10 khuẩn lạc trên VRBG	Khuẩn lạc màu hồng đến đỏ có hoặc không có quầng kết tủa bên ngoài	
						+ <i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087					
				Tinh chọn lọc		<i>Salmonella Typhimurium</i> ⁱ <i>Salmonella Enteritidis</i> ^j	00031 hoặc 00030					
						+ <i>Enterococcus faececalis</i> ^d	00009 hoặc 00087					
Fraser	L	<i>Listeria monocytogenes</i>	TCVN 7700-1 (ISO 11290-1)	Hiệu suất	(48 ± 2) h/ (37 ± 1) °C	<i>Listeria monocytogenes 4b</i> + <i>E. coli</i> ^d	00021 ^b 00012 hoặc 00013	-	Định tính	>10 khuẩn lạc trên thạch <i>Listeria</i> theo Ottaviani và Agosti	Khuẩn lạc màu xanh lục lam có quầng màu đục	
						+ <i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087					
				Tinh chọn lọc		<i>Listeria monocytogenes 1/2a</i> + <i>E. coli</i> ^d	00109 00012 hoặc 00013					
						+ <i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087					
						<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013					
						<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087	-	Định tính	< 100 khuẩn lạc trên TSA	-	

Bảng E.1 (tiếp theo)

Giolitti Cantoni	L	<i>Staphylococci</i> dương tính coagulase	TCVN 4830-3 (ISO 6888-3)	Hiệu suất	(24 ± 2) h đến (48 ± 2) h / (37 ± 1) °C	<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> ^d	00034 ^b 00012 hoặc 00013	-	Định tính	>10 khuẩn lạc trên Baird Parker hoặc RPFA	Khuẩn lạc đặc trưng theo từng môi trường (xem TCVN 4830-1 (ISO 6888-1) đối với Baird Parker và TCVN 4830-2 (ISO 6888-2) đối với RPFA)
						<i>S. aureus</i> + <i>E. Coli</i> ^d	00032 00012 hoặc 00013				
						<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0) trên TSA	-
Half-Fraser	L	<i>Listeria monocytogenes</i>	TCVN 7700-1 (ISO 11290-1)	Hiệu suất	(24 ± 2) h / (30 ± 1) °C	<i>L. monocytogenes</i> 4b + <i>E. coli</i> ^d	00021 ^b 00012 hoặc 00013 00009 hoặc 00087	-	Định tính	>10 khuẩn lạc trên Agar Listeria theo Ottaviani và Agosti	Khuẩn lạc màu xanh lục lam có quầng màu đục
						<i>L. monocytogenes</i> 1/2a + <i>E. coli</i> ^d	00109 00012 hoặc 00013 00009 hoặc 00087				
						<i>E. coli</i>	00012 hoặc 00013	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0) trên TSA	-
						+ <i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087	-	Định tính	<100 khuẩn lạc trên TSA	-
ITC	L	<i>Yersinia enterocolitica</i>	TCVN 8127 (ISO 10273)	Hiệu suất	(44 ± 4) h / (25 ± 1) °C	<i>Yersinia enterocolitica</i> + <i>E. Coli</i> ^d	00038 ^b 00012 hoặc 00013 00025	-	Định tính	> 10 khuẩn lạc trên CIN hoặc SSDC	Khuẩn lạc đặc trưng theo từng môi trường [xem TCVN 8127 (ISO 10273)]
						+ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
						<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00025	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0) trên TSA	-
						<i>Proteus mirabilis</i>	00023				

Bảng E.1 (tiếp theo)

MKTn	L	<i>Salmonella</i>	TCVN 4829 (ISO 6579)	Hiệu suất	$(24 \pm 3) \text{ h} / (37 \pm 1)^\circ\text{C}$	<i>Salmonella Enteritidis</i> ^{d,i}	00030	-	Định tính	> 10 khuẩn lạc trên XLD hoặc môi trường chọn lọc khác	Khuẩn lạc đặc trưng theo từng môi trường [xem TCVN 4829 (ISO 6579)]
						<i>Salmonella Typhimurium</i> ^{d,i} + <i>E. coli</i> ^d	00031 00012 hoặc 00013 00025				
						<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013			Định tính	Ức chế lưỡng phần < 100 khuẩn lạc trên TSA
						<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087			Định tính	< 10 khuẩn lạc trên TSA
MSRV ^k	SS	<i>Salmonella</i>	TCVN 4829 (ISO 6579)	Hiệu suất	$2 \times (24 \pm 3) \text{ h} / (41,5 \pm 1)^\circ\text{C}$	<i>Salmonella Enteritidis</i> ^{d,i}	00030	-	Định tính	Giọt mẫu được ủ có vùng bao quanh màu trắng xám, đục sau 24 h đến 48 h vùng có màu đục sẽ trôi rộng trên toàn địa	Khả năng cao: khuẩn lạc đặc trưng sau khi nuôi cấy lại trên XLD ^k
						<i>Salmonella Typhimurium</i> ^{d,i}	00031				
						<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013			Định tính	Có thể phát triển ở vị trí giọt mẫu được ủ, không có vùng bị đục
						<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087			Định tính	Không phát triển
MMG	L	<i>E. coli</i> dương tính β-D-glucuronidase	TCVN 7924-3 (ISO 16649-3)	Hiệu suất	$24 \pm 3) \text{ h} / (37 \pm 1)^\circ\text{C}$	<i>E. coli</i>	00012 ^b 00013	-	Định tính	Sinh axit	Khuẩn lạc thay đổi thành màu vàng
						<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087			Định tính	Không phát triển

Bảng E.1 (tiếp theo)

PSB	L	<i>Yersinia enterocolitica</i>	TCVN 8127 (ISO 10273)	Hiệu suất	3 ngày đến 5 ngày (24 ± 3) h/ (25 ± 1) °C	<i>Yersinia enterocolitica</i> + <i>E. coli</i> ^d + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00038 ^b 00012 hoặc 00013 00025	-	Định tính	> 10 khuẩn lạc trên CIN hoặc SSDC	Khuẩn lạc đặc trưng theo từng môi trường [xem TCVN 8127 (ISO 10273)]
						<i>Yersinia enterocolitica</i> + <i>E. coli</i> ^d + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00160 00012 hoặc 00013 00025				
						<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Proteus mirabilis</i>	00025 00023				
RVS	L	<i>Salmonella</i>	TCVN 4829 (ISO 6579)	Hiệu suất	24 ± 3) h/ ($41,5 \pm 1$) °C	<i>Salmonella Enteritidis</i> ^d <i>Salmonella Typhimurium</i> ^d + <i>E. coli</i> ^d + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00030 00031 00012 hoặc 00013 00025	-	Định tính	> 10 khuẩn lạc trên XLD hoặc môi trường chọn lọc khác	Khuẩn lạc đặc trưng theo từng môi trường [xem TCVN 4829 (ISO 6579)]
						<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013				
						<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087				
TSPB	L	<i>Bacillus cereus</i>	TCVN 7903 (ISO 21871)	Hiệu suất	(48 ± 4) h/ (30 ± 1) °C	<i>Bacillus cereus</i>	00001	-	Định tính	> 10 khuẩn lạc trên FEMBA hoặc MYP	Khuẩn lạc đặc trưng theo từng môi trường [xem TCVN 7903 (ISO 21871)]
						<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013				

Bảng E.1 (tiếp theo)

Môi trường lỏng không chọn lọc

Môi trường ^a	Typ ^a	Vi sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ú	Chứng đối chứng	Số WDCM ^c	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm soát	Chuẩn cứ	Các phản ứng đặc trưng
BHI	L	<i>Staphylococcus</i> dương tính coagulase	TCVN 4830-1 (ISO 6888-1) TCVN 4830-2 (ISO 6888-2)	Hiệu suất	(24 ± 2) h / (37 ± 1) °C	<i>Staphylococcus aureus</i>	00034	-	Định tính	Độ đục (1-2) ^f	-
Brucella	L	<i>Campylobacter</i>	TCVN 7715 (ISO 10272) (tất cả các phần)	Hiệu suất	2 ngày đến 5 ngày/ (41,5 ± 1) °C môi trường hiếu khí	<i>Campylobacter jejuni^d</i> <i>Campylobacter coli^d</i>	000156 hoặc 00005 00004	-	Định tính	Độ đục (1-2) ^f	-
Pha loãng với mục đích đặc biệt, ví dụ BPW có bromo-cresol-purpur	L	Chất lỏng pha loãng	TCVN 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần)	Pha loãng	45 min – 1 h/ 20 °C đến 25 °C	<i>E. coli^d</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	00012 hoặc 00013 00034 ^b	TSA	Định lượng	± 30 % khuẩn lạc/T ₀ (± 30 % số đếm)	-
Ringer dài một phần tư Dung dịch Pepton Muối pepton Dung dịch đậm phosphat	L	Chất lỏng pha loãng	TCVN 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần)	Pha loãng	45 min – 1 h/ 20 °C đến	<i>E. coli^d</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	00012 hoặc 00013 00034 ^b	TSA	Định lượng	± 30 % khuẩn lạc/T ₀ (± 30 % số đếm gốc)	-
Thioglycollat	L	<i>Clostridium perfringens</i>	TCVN 4991 (ISO 7937)	Hiệu suất	(21 ± 3) h / (37 ± 1) °C	<i>Clostridium perfringens</i>	00007	-	Định tính	Độ đục (1-2) ^f	-
TSYEB	L	<i>Listeria monocytogenes</i>	TCVN 7700-1 (ISO 11290) (tất cả các phần)	Hiệu suất	(21 ± 3) h / (25 ± 1) °C	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	00021 ^b 00109	-	Định tính	Độ đục (1-2) ^f	-

Bảng E.1 (tiếp theo)

Môi trường phân lập chọn lọc

Môi trường ^a	Typ ^b	Vị sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ú	Chứng đối chứng	Số WDCM ^c	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng	Chuẩn cứ	Các phản ứng đặc trưng
Thạch <i>Listeria</i> theo Ottaviani và Agosti ^d	S	<i>Listeria monocytogenes</i>	TCVN 7700 (ISO 11290)	Hiệu suất	(44 ± 4) h / (37 ± 1) °C	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	00021 ^b 00109	-	Định tính	Phát triển tốt	Khuẩn lạc xanh lục lam có quặng đục
				Tính chọn lọc		<i>Escherichia coli</i> ^d <i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00012 hoặc 00013 00009 hoặc 00087	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	-
				Độ đặc hiệu		<i>Listeria innocua</i>	00017	--	Định tính	Phát triển tốt	Khuẩn lạc xanh lục lam không có quặng đục
mCCDA ⁱ	S	<i>Campylobacter</i>	TCVN 7715 (ISO 10272) (tất cả các phân)	Hiệu suất	(44 ± 4) h / (41,5 ± 1) °C môi trường hiếu khí	<i>Campylobacter jejuni</i> ^j <i>Campylobacter coli</i>	000158 00006 00004	--	Định tính	>10 khuẩn lạc trên mCCDA	Khuẩn lạc màu xám nhạt, phẳng và ẩm đới khi có ánh màu kim loại
				Tính chọn lọc		<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	-	Định tính	Ức chế toàn phần hoặc từng phần (0-1)	Khuẩn lạc không đặc trưng
						<i>Staphylococcus aureus</i>	00034	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	-
CT-SMAC	S	<i>Escherichia coli</i> O157	TCVN 7686 (ISO 16654)	Hiệu suất	(21 ± 3) h / (37 ± 1) °C	<i>E. coli</i> O157:H7	00014 (chuỗi không sinh độc tố)	-	Định tính	Phát triển tốt (2)	Khuẩn lạc trong suốt, dạng đĩa màu nâu vàng và đường kính ~ 1 mm
				Tính chọn lọc		<i>Staphylococcus aureus</i> ^d	00032 hoặc 00034	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	-
						<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	-	Định tính	Ức chế từng phần (0)	Một số khuẩn lạc màu hồng phát triển

Bảng E.1 (tiếp theo)

CIN SSDC	S	<i>Yersinia enterocolitica</i>	TCVN 8127 (ISO 10273)	Hiệu suất	(21 ± 3) h / (30 ± 1) °C	<i>Yersinia enterocolitica</i>	00038 ^b 00160	-	Định tính	Phát triển tốt (2)	Khuẩn lạc đặc trưng theo từng môi trường [xem TCVN 8127 (ISO 10273)]
				Tính chọn lọc		<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	-	Định tính	Ức chế toàn phần hoặc từng phần (0-1)	Khuẩn lạc không đặc trưng
						<i>Staphylococcus aureus</i> ^d	00034	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	-
CPC mCPC	S	<i>Vibrio</i> spp. ngoại trừ <i>Vibrio parahaemolyticus/</i> <i>V. cholerae</i>	TCVN 7905-2 (ISO/TS 21872-2)	Hiệu suất	(24 ± 3) h / (37 ± 1) °C	<i>Vibrio vulnificus</i>	00187 ^b	-	Định tính	Phát triển tốt (2)	Khuẩn lạc màu vàng được bao quanh do nhuộm màu vàng môi trường
				Tính chọn lọc		<i>Vibrio cholerae</i> non-01/non-0139	00203 ^b	-	Định tính	Phát triển tốt (2)	Khuẩn lạc đỗ tía được bao quanh do nhuộm màu đỗ tía môi trường
						<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013 hoặc 00090	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	-
MYP ^j	S	<i>Bacillus cereus</i>	TCVN 7903 (ISO 21871)	Hiệu suất	(21 ± 3) h đến 48 h / (30 ± 1) °C	<i>Bacillus cereus</i>	00001	-	Định tính	Phát triển tốt (2)	Khuẩn lạc màu hồng có quầng kết tua
				Tính chọn lọc		<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	-
				Độ đặc hiệu		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	00003	-	Định tính	-	Khuẩn lạc màu vàng không có quầng kết tua
PEMBA	S	<i>Bacillus cereus</i>	TCVN 7903 (ISO 21871)	Hiệu suất	(21 ± 3) h đến (44 ± 4) h / (37 ± 1) °C	<i>Bacillus cereus</i>	00001	-	Định tính	Phát triển tối (2)	Khuẩn lạc màu ngọc lam có quarella kết tua
				Tính chọn lọc		<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	-
				Độ đặc hiệu		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	00003	-	Định tính	-	Khuẩn lạc màu trắng không có quarella kết tua

Bảng E.1 (tiếp theo)

SDS	S	<i>Vibrio</i> spp. ngoại trừ <i>Vibrio parahaemolyticus/</i> <i>V.cholerae</i>	TCVN 7905-2 (ISO/TS 21872-2)	Hiệu suất	(24 ± 3) h / (37 ± 1) °C	<i>Vibrio vulnificus</i>	00187 ^b	-	Định tính	Phát triển tốt (2)	Khuẩn lạc màu xanh lục/dò tia có quặng kết tủa
						<i>Vibrio cholerae non-</i> 01/ <i>non-0139</i>	00203 ^b	-	Định tính	Phát triển tốt (2)	Khuẩn lạc màu vàng có quặng kết tủa
				Tính chọn lọc		<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013 hoặc 00090	-	Định tính	Ức chế tổn phản (0)	-
TBX ^j	S	<i>E. coli</i> dương tính β-D-glucuronidase	TCVN 7924-3 (ISO 16649-3)	Hiệu suất	(21 ± 3) h/ (44 ± 1) °C	<i>E. coli</i> ⁱ	00012 ^d 00013 ^d 00202 ^b	-	Định tính	Phát triển tốt (2)	Khuẩn lạc màu xanh lam
						<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087	-	Định tính	Phát triển tốt (2)	-
				Độ đặc hiệu		<i>Citrobacter freundii</i> <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	00006 ^b 00025	-	Định tính	-	Khuẩn lạc màu trắng đến xanh lục-xanh be
VRBG ⁱ	S	<i>Enterobacteriaceae</i>	TCVN 5518-1 (ISO 21528-1)	Hiệu suất	(24 ± 2) h/ (37 ± 1) °C	<i>E. coli</i>	00012 ^b 00013 00031 hoặc 00032	-	Định tính	Phát triển tốt (2)	Khuẩn lạc màu hồng đến đỏ, có hoặc không có quặng kết tủa bên ngoài
						<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> ⁱ <i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> ⁱ	00009 hoặc 00087	-	Định tính	Ức chế toàn phản (0)	
				Tính chọn lọc		<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> ^d	00031 00030	-	Định tính	-	-
XLD	S	<i>Salmonella</i>	TCVN 4829 (ISO 6579)	Hiệu suất	(24 ± 3) h / (37 ± 1) °C	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> ^{d,l} <i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i> ^{d,l}	00012 hoặc 00013	-	Định tính	-	Khuẩn lạc có tâm màu đen và viền trong, màu đỏ nhạt do sự thay đổi màu của môi trường
						<i>E. coli</i> ^d	00009 hoặc 00087	-	Định tính	Phát triển hoặc ức chế từng phản (0-1)	Khuẩn lạc màu vàng
				Tính chọn lọc		<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> ^d	00031 00030	-	Định tính	Ức chế toàn phản (0)	-

Bảng E.1 (tiếp theo)

Môi trường phân lập không chọn lọc											
Môi trường ^a	Typ ^b	Vi sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ú	Chủng đối chứng	Số WDCM ^c	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng	Chuẩn cứ	Các phản ứng đặc trưng
Thạch dinh dưỡng	S	<i>Enterobacteriaceae</i>	TCVN 5518 (ISO 21528 (tất cả các phần))	Hiệu suất	(24 ± 3) h / (37 ± 1) °C	<i>E. coli</i>	00012 ^b 00013	-	Định tính	Phát triển tốt (2)	-
		<i>Salmonella</i>	TCVN 4829 (ISO 6579)		(24 ± 3) h / (37 ± 1) °C	<i>Salmonella Typhimurium</i> ^{d,l} <i>Salmonella Enteritidis</i> ^{d,l}	00030 00031				
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	TCVN 8127 (ISO 10273)		(24 ± 2) h / (30 ± 1) °C	<i>Yersinia enterocolitica</i>	00038 ^b 000160				
TSYEA	S	<i>Listeria monocytogenes</i>	TCVN 7700 (ISO 11290) (tất cả các phần)	Hiệu suất	(21 ± 3) h / (37 ± 1) °C	<i>Listeria monocytogenes</i> 4 ^b <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	00021 ^b 00109	-	Định tính	Phát triển tốt (2)	-
Môi trường dùng cho nhiều mục đích											
Môi trường ^a	Typ ^b	Vi sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ú	Chủng đối chứng	Số WDCM ^c	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng	Chuẩn cứ	Các phản ứng đặc trưng
BPW ^m	L	Pha loãng để đếm tất cả vi sinh vật	TCVN 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần) TCVN 6507-5 (ISO 6887-5)	Pha loãng	45 min đến 1 h / 20 °C đến 25 °C	<i>E. coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	00012 ^b 00013 00034 ^b	TSA	Định lượng	± 30 % khuân lạc/T ₀ (± 30 % số đếm gốc)	-

Bảng E.1 (tiếp theo)

BPW ⁿ		Pha loãng để đếm <i>Listeria monocytogenes</i>	TCVN 7700-2 (ISO 11290-2)	Pha loãng	(1 h ± 5 min) / (20 ± 2) °C	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	00021 ^b 00109	TSA	Định lượng	± 30 % khuỷn lạc/T ₀ (± 30 % số đếm gốc)	-
		Tăng sinh sơ bộ để phát hiện <i>Salmonella</i>	TCVN 4829 (ISO 6579)	Hiệu suất	(18 ± 2) h / (37 ± 1) °C	<i>Salmonella</i> Typhimurium ^{d,l} <i>Salmonella</i> Enteritidis ^{d,l}	00031 00030	-	Định tính	Độ đặc (1-2) ^f	-
		Tăng sinh sơ bộ để phát hiện <i>Enterobacteriaceae</i>	TCVN 5518-1 (ISO 21528-1)	Hiệu suất	(18 ± 2) h / (37 ± 1) °C	<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> Typhimurium ^{d,l} <i>Salmonella</i> Enteritidis ^d	00012 ^b 00013 00031 hoặc 00032	-	Định tính	Độ đặc (1-2) ^f	-

Môi trường đối chứng đối với số đếm vi sinh vật

Môi trường*	Typ ^g	Vị sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ú	Chứng đối chứng	Số WDCM ^c	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng	Chuẩn cù	Các phản ứng đặc trưng
Thạch máu	S	^h <i>Campylobacter</i>	TCVN 7715-2 (ISO 10272-2)	Hiệu suất	(44 ± 4) h / (41,5 ± 1) °C	<i>Campylobacter jejuni</i> ^d <i>Campylobacter coli</i>	000156 00005 00004	Mè môi trường thạch máu đã được đánh giá	Định lượng	P _R ≥ 0,7	-
TSA ⁿ	S	Đếm khuỷn lạc	-	Hiệu suất	Theo qui định trong phương pháp mà TSA được dùng làm môi trường đối chứng	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus subtilis</i> supsp. <i>spizizenii</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> O157:H7 <i>Listeria monocytogenes</i> 4b <i>Staphylococcus aureus</i>	00001 00003 00012 00014 (chứng không sinh đặc tố) 00021 00034	Mè môi trường TSA đã được đánh giá	Định lượng	P _R ≥ 0,7	Khuỷn lạc đặc trưng theo từng loài

Bảng E.1 (kết thúc)

SDA	S	Đếm khuẩn lạc	-	Hiệu suất	Theo qui định trong phương pháp mà SDA được dùng làm môi trường đối chứng	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus brasiliensis</i>	00058 ^b	Mě môi trường SDA đã được đánh giá	Định lượng	$P_R \geq 0,7$	Khuẩn lạc/chồi/mầm đặc trưng theo từng loài
-----	---	---------------	---	-----------	---------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------	--------------------	------------------------------------	------------	----------------	---------------------------------------------

^a Tên gọi đầy đủ của các môi trường viết tắt nêu trong Bảng E.2.
^b Các chủng được thử nghiệm ít nhất.
^c Tham khảo bảng kê chủng đối chủng có sẵn trên <http://www.wfcc.info> về thông tin số lượng chủng của bộ sưu tập giống và các chi tiết liên lạc;
^d Chủng được chọn tự do, một trong các chủng được sử dụng ít nhất.
^e L: môi trường lỏng; S: môi trường đặc; SS: môi trường bán đặc
^f Phát triển/độ đục được phân loại như sau: 0 – không phát triển/không đục; 1 – phát triển yếu/hơi đục và 2 – phát triển/có đục (xem 7.4.2.1, 8.4.1).
^g *Escherichia coli* WDCM 00013 được nêu trong tiêu chuẩn cụ thể.
^h *Escherichia coli* WDCM 00013 là chất sản xuất ra β-d-gluconidase mạnh và WDCM 00202 chất sản xuất ra β-d-gluconidase yếu.
ⁱ Một số quy định và hạn chế của quốc gia về sử dụng typ huyết thanh khác. Xem các yêu cầu hiện hành về việc chọn typ huyết thanh *Salmonella*.
^j Trong trường hợp sử dụng phép thử định tính và định lượng đối với môi trường thi chỉ cần các kết quả định lượng (xem Bảng E.1).
^k Các chi tiết về kiểm soát chất lượng môi trường MSRV kê cả nồng độ cuối cùng của chất cấy và các tiêu chí được nêu trong TCVN 4829 (ISO 6579).
^l Nếu môi trường dinh dưỡng được sử dụng cho hai hoặc ba ứng dụng khác nhau: ít nhất là thực hiện phép thử phát triển *Salmonella* (nếu phòng thử nghiệm thực hiện thử vi sinh vật này).
^m Nếu môi trường BPW được sử dụng cho hai hoặc ba ứng dụng khác nhau: ít nhất là thực hiện phép thử phát triển *Salmonella* (nếu phòng thử nghiệm thực hiện thử vi sinh vật này).
ⁿ Chọn các chủng theo phương pháp có sử dụng TSA làm môi trường đối chứng.

Bảng E.2 – Các thuật ngữ viết tắt về môi trường được sử dụng trong Bảng E.1

Thuật ngữ môi trường viết tắt	Tên đầy đủ của môi trường	Tiêu chuẩn
Baird-Parker	Thạch Baird-Parker	TCVN 4830-1 (ISO 6888-1)
BGBLB	Canh thang lactose mật lục sáng	TCVN 4882 (ISO 4831)
BHI	Canh thang tim não	TCVN 4830-1 (ISO 6888-1) và TCVN 4830-3 (ISO 6888-3)
Bolton	Canh thang Bolton	TCVN 7715-1 (ISO 10272-1)
BPW	Nước đệm pepton	TCVN 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần), TCVN 4829 (ISO 6579), TCVN 7700-2 (ISO 11290-2), TCVN 5518-1 (ISO 21528-1)
Brucella	Canh thang Brucella	TCVN 7715 (ISO 10272) (tất cả các phần)
CFC	Thạch xetrimit, fuxidin và xephacloridin	TCVN 7138 (ISO 13720)
CIN	Thạch cefsulodin, Irgasan novobiocin	TCVN 8127 (ISO 10273)
CPC	Thạch xentulose polymixin B colistin	TCVN 7905-2 (ISO/TS 21872-2)
CT-SMAC	Thạch MacConkey sorbitol telurit xefixim	TCVN 7686 (ISO 16654)
DG18	Thạch Dichloran glycerol	TCVN 8275-2 (ISO 21527-2)
DRBC	Thạch Dichloran-rose bengal chloramphenicol	TCVN 8275-1 (ISO 21527-1)
EC	Canh thang EC	TCVN 6846 (ISO 7251)
EE	Canh thang glucose mật lục sáng, có đệm	TCVN 5518-1 (ISO 21528-1)
Fraser	Canh thang Fraser	TCVN 7700-1 (ISO 11290-1)
Half-Fraser	Canh thang nửa Fraser	TCVN 8127 (ISO 10273)
IS ("TS")	Thạch sắt sulfit (Thạch tryptose sulfit)	TCVN 7902 (ISO 15213)
ITC	Canh thang Irgasan, ticarcillin chlorat	TCVN 8127 (ISO 10273)
LST	Canh thang Lauryl sulfat, triptose lauryl	TCVN 4882 (ISO 4831) và TCVN 6846 (ISO 7251)
mCCDA	Thạch deoxycholat cefoperazon than cải biến	TCVN 7715 (ISO 10272) (tất cả các phần)
mCPC	Thạch colistin B polymyxin xellobiose cải biến	TCVN 7905-2 (ISO/TS 21872-2)
MKTn	Môi trường novobiocin tetrathionate Muller-Kauffmann	TCVN 4829 (ISO 6579)
MMG	Môi trường glutamate khoáng cải biến	TCVN 7924-3 (ISO 16649-3)
MPCA	Thạch đếm đĩa có sữa già/thạch đếm đĩa có sữa	TCVN 4884 (ISO 4833)
MRS	Môi trường MRS (de Man, Rogosa và Sharpe)	TCVN 7906 (ISO 15214)

Bảng E.2 (kết thúc)

Thuật ngữ môi trường viết tắt	Tên đầy đủ của môi trường	Tiêu chuẩn
MSRV	Môi trường rappaport-Vassiliadis bán đặc cài biển	TCVN 4829 (ISO 6579)
MYP	Thạch mannitol lòng đỏ trứng polymyxin	TCVN 4992 (ISO 7932)
PCA	Thạch đếm đĩa	TCVN 4884 (ISO 4833)
PEMBA	Thạch bromothymol mannitol lòng đỏ trứng pyruvat polymyxin	TCVN 7903 (ISO 21871)
PPA	Thạch penicillin và pimaricin	TCVN 8899 (ISO/TS 11059)
PSB	Canh thang sorbitol và pepton muối mặn	TCVN 8127 (ISO 10273)
RPFA	Thạch fibrinogen huyết tương thỏ	TCVN 4830-2 (ISO 6888-2)
RVS	Canh thang Rappaport-Vassiliadis pepton đậu tương	TCVN 4829 (ISO 6579)
SDA	Thạch Sabouraud dextrose	-
SDS	Thạch natri dodecyl sulfat polymyxin sucarose	TCVN 7905-2 (ISO/TS 21872-2)
SSDC	Thạch Salmonella Shigella deoxycholate và canxi	TCVN 8127 (ISO 10273)
TBX	Thạch trypton mêt X-glucuronit	TCVN 7924 (ISO 16649) (tất cả các phần)
TCBS	Thạch sucarose, muối mêt, xitrat và thiosulfat	TCVN 7905-1 (ISO/TS 21872-1)
Thioglycollate	Môi trường thioglycolat lòng	TCVN 4991 (ISO 7937)
TSA	Thạch trypton đậu tương	-
TSC/SC	Thạch sulfit xycloserin/thạch sulfit xycloserin không chứa lòng đỏ trứng	TCVN 4991 (ISO 7937)
TSPB	Thạch polymyxin trypton đậu tương	TCVN 7903 (ISO 21871)
TSYEA	Thạch chất chiết nấm men trypton đậu tương	TCVN 7700 (ISO 11290) (tất cả các phần)
TSYEB	Canh thang chất chiết nấm men trypton đậu tương	TCVN 7700 (ISO 11290) (tất cả các phần)
VRBG	Thạch glucose mêt đỗ tím	TCVN 5518 (ISO 21528) (tất cả các phần)
VRBL	Thạch lactose mêt đỗ tím	TCVN 6848 (ISO 4832)
XLD	Thạch deoxycholate lysin xylose	TCVN 4829 (ISO 6579)

Phụ lục F

(Quy định)

**Các vi sinh vật thử nghiệm và các tiêu chí hiệu năng đối với môi trường
nuôi cấy khuẩn lạc được sử dụng cho vi sinh vật trong nước**

Các chủng đặc thù được chọn để thử nghiệm để đảm bảo sự nhất quán giữa các phòng thử nghiệm và để chứng minh sự khác nhau giữa các môi trường (giữa các mẻ, giữa các nhà sản xuất). Các chủng nêu trong Bảng F.1 đã được đánh giá đầy đủ để đảm bảo sự phù hợp và thống nhất về hiệu năng.

Khi có nhiều hơn một chủng được liệt kê cho mỗi khía cạnh của phép thử hiệu năng (hiệu suất, tính chọn lọc, tính đặc hiệu) thì ít nhất các chủng được sử dụng phải được viết rõ. Các nhà cung cấp môi trường thương mại hoặc phi thương mại dự kiến sử dụng các chủng bổ sung, ví dụ: các chủng nêu trong Bảng F.1 để đảm bảo thêm về chất lượng của môi trường nuôi cấy mà họ áp dụng.

Các tiêu chí này phải bao gồm trong các tiêu chuẩn cụ thể khi được xây dựng và soát xét. Mẻ môi trường nuôi cấy đã được đánh giá hiệu lực là mẻ môi trường đáp ứng được hiệu năng. Số lượng chủng được quy định trong Bảng F.1 là số lượng từ bảng kê của các bộ định danh chủng phổ biến do Trung tâm Dữ liệu Thế giới về Vi sinh vật (WDCM) cung cấp. [20] Bảng kê này có chứa chi tiết các chủng đối chứng được thể hiện bằng mỗi số WDCM và các chi tiết liên lạc của các bộ sưu tập giống. Tất cả các môi trường trích dẫn được quy định trong các tiêu chuẩn quốc tế (ISO) và tiêu chuẩn quốc gia (TCVN).

Nếu gặp phải sự biến đổi về chủng, thì nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy (ví dụ: thu lấy cùng môi trường từ các nhà sản xuất khác nhau), thu lấy giống đối chứng bổ sung từ bộ sưu tập giống gốc. Người sử dụng phải phản hồi về sự biến đổi về chủng cho WG5 Môi trường nuôi cấy của ISO/TC34/SC9.

Các Chú thích được sử dụng trong Bảng F.1 như sau:

- a Tên gọi đầy đủ của các thuật ngữ môi trường viết tắt nêu trong Bảng F.2.
- b Các chủng được sử dụng ít nhất;
- c Tham khảo đến bảng kê chủng đối chứng có sẵn trên <http://www.wfcc.info> về thông tin số lượng chủng của bộ sưu tập giống và các chi tiết liên lạc.
- d Chủng được chọn tự do, một trong các chủng được sử dụng ít nhất.
- e L: môi trường lỏng; S: môi trường đặc; SS: môi trường bán đặc
- f Các chi tiết về môi trường *Legionella*, kể cả bảo quản các chủng đối chứng, được nêu trong ISO 11731.
- g Các chi tiết về kiểm soát chất lượng và các tiêu chí chất lượng môi trường MUG/EC được nêu trong ISO 9308, Phụ lục E, còn tính chọn lọc không được quy định trong tiêu chuẩn này.
- h Các chi tiết về kiểm soát chất lượng và các tiêu chí chất lượng môi trường MUD/EC được nêu trong ISO 7899-1:1998, Phụ lục E.
- i Một số quy định và hạn chế của quốc gia về sử dụng typ huyết thanh khác. Xem các yêu cầu hiện hành về việc chọn typ huyết thanh *Salmonella*.
- j Phát triển/độ đục được phân loại như sau: 0 – không phát triển/không đục; 1 – phát triển yếu/hoi đục và 2 – phát triển/có đục (xem 7.4.2.1, 8.4.1).
- k Nếu môi trường dinh dưỡng được sử dụng cho hai hoặc ba ứng dụng khác nhau: ít nhất là thực hiện phép thử phát triển *Salmonella* (nếu phòng thử nghiệm thực hiện thử vi sinh vật này).
- l Chọn các chủng theo phương pháp sử dụng trong đó TSA được dùng làm môi trường đối chứng.

Bảng F.1 – Các vi sinh vật thử nghiệm và các tiêu chí hiệu năng của môi trường nuôi cấy thường dùng trong vi sinh vật nước

Môi trường chọn lọc để đếm vi sinh vật bằng cách so sánh với môi trường đối chứng không chọn lọc											
Môi trường ^a	Typ ^b	Vi sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ủ	Đối chứng	Số WDCM ^c	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng	Chuẩn cứ	Các phản ứng đặc trưng
Colilert	L	<i>E. coli</i> /vi khuẩn Coliform	TCVN 6187-2 (ISO 9308-2)	Hiệu suất	(20 ± 2) h/ (36 ± 2) °C	<i>E. coli</i>	00013 ^b 00090	TSA	Định lượng	P _R ≥ 0,5	Khuẩn lạc màu vàng và có huỳnh quang đối với <i>E. coli</i>
						<i>Klebsiella pneumoniae</i>	00206	TSA	Định lượng	P _R ≥ 0,5	Khuẩn lạc màu vàng không nhạt hơn màu của mẫu kiểm chứng đối với vi khuẩn coliform
				Tính chọn lọc		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^d	00027 hoặc 00025	–	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	Khuẩn lạc màu vàng nhạt hơn màu của mẫu kiểm chứng
GVPC ^f	S	<i>Legionella</i>	ISO 11731 và 11721-2	Hiệu suất	2 ngày đến 5 ngày/(36 ± 2) °C	<i>Legionella pneumophila</i>	00107 ^b 00180	BCYE	Định lượng	P _R ≥ 0,5	Khuẩn lạc màu trắng-xám-xanh lam-dۆ tía có gờ và tròn bóng đặc trưng
					5 ngày đến 10 ngày /(36 ± 2) °C	<i>Legionella anisa</i>	00106				
				Tính chọn lọc	3 ngày/ (36 ± 2) °C	<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087	–	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	–
						<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^d	00026 hoặc 00025				–
						<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013				Ức chế toàn phần hoặc từng phần (0)
Lactose TTC	S	<i>E. coli</i> /vi khuẩn Coliform	TCVN 6187-1 (ISO 9308-1)	Hiệu suất	(21 ± 3) h/ (44 ± 1) °C	<i>E. coli</i>	00179 ^b 00012 00013 00175	TSA	Định lượng	P _R ≥ 0,5	Khuẩn lạc màu vàng trong môi trường có màng
						<i>Enterococcus aerogenes</i>	00006				–
				Tính chọn lọc		<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087	–	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	–
				Độ đặc hiệu		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^d	00025 hoặc 00026	–	Định tính	–	Khuẩn lạc màu đỏ, xanh trong môi trường

Bảng F.1 (tiếp theo)

Môi trường ^a	Typ ^a	Vật sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ú	Chứng đối chứng	Số WDCM ^c	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng	Chuẩn cứ	Các phản ứng đặc trưng
mCP	S	<i>Clostridium perfringens</i>	98/83/EC	Hiệu suất	$(21 \pm 3) \text{ h}$ / $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ môi trường kị khí	<i>Clostridium perfringens</i>	00007 ^b 00080 00174	TSA hoặc môi trường không chọn lọc khác đối với vi khuẩn kị khí	Định lượng	$P_R \geq 0,5$	Khuẩn lạc màu vàng; dương tính với phép thử phosphatase
				Tinh chọn lọc		<i>Clostridium bifementans</i>	00079	-	Định tính	-	Khuẩn lạc màu xanh lam; âm tính với phép thử phosphatase
				Độ đặc hiệu		<i>E. coli</i>	00012 hoặc 00013	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	-
Pseudomonas CN	S	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TCVN 8881 (ISO 16266)	Hiệu suất	$(44 \pm 4) \text{ h}$ / $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00024 ^b 00025 00026	TSA	Định lượng	$P_R \geq 0,5$	Khuẩn lạc màu lục lam có huỳnh quang trong dài UV ($360 \pm 20 \text{ nm}$)
				Tinh chọn lọc		<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	-	Định tính	Ức chế toàn phần (0)	-
						<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087				
Stanetz và Bartley	S	Enterococci đường ruột	TCVN 6189-2 (ISO 7899-2)	Hiệu suất	$(44 \pm 4) \text{ h}$ / $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$	<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 ^b 00087 00176 00177 00178	TSA	Định lượng	$P_R \geq 0,5$	Khuẩn lạc màu đỏ-nâu sẫm-hồng
				Tinh chọn lọc		<i>Enterococcus faecium</i> ^d					
						<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	-	Định tính	-	-
						<i>Staphylococcus aureus</i> ^d	00032 hoặc 00034				

Bảng F.1 (tiếp theo)

Sát sulfit Trypose sulfit (TS)	S	Vi khuẩn kị khí khử sulfit (clostridia)	TCVN 6191-2 (ISO 6461-2)	Hiệu suất	(44 ± 4) h/ (37 ± 1) °C môi trường yếm khí	<i>Clostridium perfringens</i>	00007 ^b 00080	TSA hoặc môi trường thạch máu hoặc môi trường chọn lọc khác đối với vi khuẩn kị khí	Định lượng	$P_R \geq 0,5$	Khuẩn lạc màu đen
						<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	-	Định tính	-	Khuẩn lạc không có màu đen
TSC	S	<i>Clostridium perfringens</i>	ISO 14189	Hiệu suất	(21 ± 3) h/ (44 ± 1) °C môi trường kị khí	<i>Clostridium perfringens</i>	00007 ^b 00080 00174	TSA hoặc môi trường thạch máu hoặc môi trường chọn lọc khác đối với vi khuẩn kị khí	Định lượng	$P_R \geq 0,5$	Khuẩn lạc màu đen
						<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	00003	-	Định tính	Úc chế toàn phần (0)	-

Môi trường chọn lọc để đếm vi sinh vật bằng cách so sánh với mè đã được chấp nhận trước đó (sử dụng trong trường hợp đặc biệt)

Môi trường ^a	Typ ^a	Vi sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ù	Chứng đối chứng	Số WDCM ^c	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng	Chuẩn cứ	Các phản ứng đặc trưng
Colilert	L	<i>E. coli</i> /vi khuẩn coliform	TCVN 6187-2 (ISO 9308-2)	Hiệu suất	(20 ± 2) h/ (36 ± 2) °C	<i>E. coli</i>	00013 ^b 00090	Mè Colilert được đánh giá trước đó	Định lượng	$P_R \geq 0,7$	Khuẩn lạc màu vàng và có huỳnh quang đối với <i>E. coli</i>
						<i>Klebsiella pneumoniae</i>	00206	Mè Colilert được đánh giá trước đó	Định lượng	$P_R \geq 0,7$	Khuẩn lạc màu vàng không nhạt hơn màu của mẫu kiểm chứng đối với vi khuẩn coliform
				Tinh chọn lọc		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^d	00027 hoặc 00125	-	Định tính	Úc chế toàn phần (0)	Khuẩn lạc màu vàng nhạt hơn màu của mẫu kiểm chứng

Bảng F.1 (tiếp theo)

GVPC ^f	S	<i>Legionella</i>	ISO 11731 và 11721-2	Hiệu suất	2 ngày đến 5 ngày/(36 ± 2) °C	<i>Legionella pneumophila</i>	00107 ^b 00180	Mè môi trường GVPC đã được đánh giá	Định lượng	$P_R \geq 0,5$	Khuẩn lạc màu trắng-xám-xanh lam-dò tia có gờ và tròn bóng đặc trung
					5 ngày đến 10 ngày/(36 ± 2) °C	<i>Legionella anisa</i>	00106				
					Tính chọn lọc	3 ngày/ (36 ± 2) °C	<i>Enterococcus faecalis^d</i>	00009 hoặc 00087	-	Định tính	Ức chế tổn phần (0)
							<i>Pseudomonas aeruginosa^d</i> <i>E. coli^d</i>	00026 hoặc 00025 00012 hoặc 00013	-	Định tính	Ức chế tổn phần hoặc từng phần (0-1)
Lactose TTC	S	<i>E. coli</i> /vi khuẩn Coliform	TCVN 6187-1 (ISO 9308- 1)	Hiệu suất	(21 ± 3) h/ (36 ± 2) °C	<i>E. coli</i>	00179 ^b 00012 00013 00175 00006	Mè môi trường lactose TTC đã được đánh giá	Định lượng	$P_R \geq 0,7$	Khuẩn lạc màu vàng trong môi trường có màng
						<i>Enterococcus aerogenes</i>	00009 hoặc 00087	-			
						<i>Citrobacter freundii</i>					
				Tính chọn lọc		<i>Enterococcus faecalis^d</i>	00025 hoặc 00026	-	Định tính	Ức chế tổn phần (0)	-
						<i>Pseudomonas aeruginosa^d</i>			Định tính	-	Khuẩn lạc màu đỏ, xanh trong môi trường
mCP	S	<i>Clostridium perfringens</i>	98/83/EC	Hiệu suất	(21 ± 3) h/ (44 ± 1) °C môi trường kị khí	<i>Clostridium perfringens</i>	00007 ^b 00080 00174	Mè môi trường mCP đã được đánh giá	Định lượng	$P_R \geq 0,7$	Khuẩn lạc màu vàng; dương tính với phép thử phosphatase
						<i>Clostridium butyfermentans</i>	00079	-			
				Tính chọn lọc		<i>E. coli^d</i>	00012 hoặc 00013	-	Định tính	Ức chế tổn phần (0)	-

Bảng F.1 (tiếp theo)

<i>Pseudomonas</i> CN	S	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	TCVN 8881 (ISO 16266)	Hiệu suất	(44 ± 4) h/ (36 ± 2) °C	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	00024 ^b 00025 00026	Mè môi trường <i>pseudo-</i> <i>monas</i> CN đã được đánh giá	Định lượng	$P_R \geq 0,7$	Khuẩn lạc màu lục lam có huỳnh quang trong dải UV (360 ± 20 nm)	
						<i>E. coli</i> ^d <i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> ^d	00012 hoặc 00013 00009 hoặc 00087	-	Định tính	Ức chế toàn phân (0)	-	
Slanetz và Bartley	S	Enterococci ruột	TCVN 6189-2 (ISO 7899- 2)	Hiệu suất	(44 ± 4) h/ (36 ± 2) °C	<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i>	00008 ^b 00087 00176	Mè môi trường Slanetz và Bartley đã đánh giá	Định lượng	$P_R \geq 0,7$	Khuẩn lạc màu đỏ-nâu sẫm-hồng	
						<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> ^d	00177 00178	-	Định tính	Ức chế toàn phân (0)	-	
				Tính chọn lọc		<i>E. coli</i> ^d <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ^d	00012 hoặc 00013 00032 hoặc 00034	-	Định tính	Ức chế toàn phân (0)	-	
						<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	00007 ^b 00080	Mè môi trường sát sulfit hoặc TS đã được đánh giá	Định lượng	$P_R \geq 0,7$	Khuẩn lạc màu đen	
Sát sulfit Trypose sulfit (TS)	S	Vi khuẩn kị khí khử sulfit (clostridia)	TCVN 6191-2 (ISO 6461- 2)	Hiệu suất	(44 ± 4) h/ (37 ± 1) °C môi trường yếm khí	<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	-	Định tính	-	Khuẩn lạc không có màu đen	
						<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	00007 ^b 00080 00174	Mè môi trường TSC đã được đánh giá	Định lượng	$P_R \geq 0,7$	Khuẩn lạc màu đen	
TSC	S	<i>Clostridium perfringens</i>	ISO 14189	Hiệu suất	(21 ± 3) h/ (44 ± 1) °C môi trường kị khí	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	00003	-	Định tính	Ức chế toute phần (0)	-	

Bảng F.1 (tiếp theo)

Môi trường không chọn lọc đối với số đếm vi sinh vật														
YEA	S	Flora tổng số	ISO 6222	Hiệu suất	(44 ± 4) h/ (36 ± 2) °C	E. coli ^d <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	00012 hoặc 00013 00003	Môi trường YEA đã được đánh giá	Định lượng	P _R ≥ 0,7	-			
Môi trường tăng sinh chọn lọc														
Môi trường ^a	Typ ^b	Vi sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ú	Chủng đối chứng	Số WDCM ^c	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng	Chuẩn cứ	Các phản ứng đặc trưng			
Bolton preston	L	<i>Campylobacter</i>	ISO 17995	Hiệu suất	((44 ± 4) h/ (37 ± 1) °C môi trường hiếu khí	<i>Campylobacter jejuni</i> ^d <i>Campylobacter coli</i> ^d + E. coli + <i>Proteus mirabilis</i>	000156 00005 00004 00012 hoặc 00013 00023	-	Định tính	>10 khuẩn lạc trên mCCDA	Khuẩn lạc nhỏ, phẳng hoặc lồi, bờ mặt bóng			
				Tinh chọn lọc		E. coli ^d <i>Proteus mirabilis</i>	00012 hoặc 00013 00023							
MUG/EV ^d	L	E. coli/vi khuẩn coliform	ISO 9308-3	Hiệu suất	48 h/ (44 ± 0,5) °C	E. coli	00179	Chi tiết về phương pháp kiểm soát và tiêu chí chất lượng của môi trường MUG/EC nêu trong Phụ lục E của ISO 9308-3:1998.						
MUD/SF ^d	L	Enterococci ruột	TCVN 6189-1 (ISO 7899-1)	Hiệu suất	(44 ± 4) h/ (44 ± 0,5) °C	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus hirae</i> <i>Enterococcus faecium</i>	00176 00177 00178	Chi tiết về phương pháp kiểm soát và tiêu chí chất lượng của môi trường MUD/SF nêu trong Phụ lục E của TCVN 6189-2:2009 (ISO 7899-2:2000)						
				Tinh chọn lọc		<i>Aerococcus viridans</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	00061 00018 00132							

Bảng F.1 (tiếp theo)

RVS	L	<i>Salmonella</i>	TCVN 9717 (ISO 19250)	Hiệu suất	(24 ± 3) h/ (41,5 ± 1) °C	<i>Salmonella Enteritidis</i> ^{d,l} <i>Salmonella Typhimurium</i> ^{d,l} + <i>E. coli</i> ^d + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00030 00031 00012 hoặc 00013 00025	-	Định tính	> 10 khuẩn lạc trên XLD hoặc môi trường chọn lọc khác	Khuẩn lạc đặc trưng theo từng môi trường (xem tiêu chuẩn)
					Tinh chọn lọc	<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	-	Định tính	Ức chế tăng phần ≤ 100 khuẩn lạc trên TSA	-
						<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087	-	Định tính	< 10 khuẩn lạc trên TSA	-
						Môi trường chất lỏng không chọn lọc					
Môi trường ^a	Typ ^b	Vị sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ù	Chứng đối chứng	Số WDCM ^c	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng	Chuẩn cứ	Các phản ứng đặc trưng
DRCM	L	Ví khuẩn kị khí khử sulfit (clostridia)	TCVN 6191-1 (ISO 6461-1)	Hiệu suất	(44 ± 4) h/ (36 ± 1) °C môi trường yếm khí	<i>Clostridium perfringens</i>	00007 ^b 00080	-	Định tính	Độ đục (1-2) ^j	Khuẩn lạc màu đen
				Độ đặc hiệu		<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	-	Định tính	Độ đục (0-1) ^j	Khuẩn lạc không có màu đen
Nước muối	L	Các dịch lỏng pha loãng	TCVN 9716 (ISO 8199)	Dịch pha loãng	45 min đến 1 h/ (20 đến 25) °C	<i>E. coli</i> ^d <i>Staphylococcus aureus</i>	00012 hoặc 00013 00034	TSA	Định lượng	± 30 % khuẩn lạc/T ₀ (± 30 % số đếm ban đầu)	-
Dịch pha loãng pepton											
Dung dịch muối pepton											
Dung dịch Ringer (nồng độ 1/4)											
Dung dịch đệm phosphat											

Bảng F.1 (tiếp theo)

Môi trường phân lập chọn lọc											
Môi trường ^a	Typ ^b	Ví sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ù	Chủng đối chứng	Số WDCM ^c	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng	Chuẩn cứ	Các phản ứng đặc trưng
mCCDA	S	<i>Campylobacter</i>	ISO 17995	Hiệu suất	(44 ± 4) h / (41,5 ± 1) °C môi trường hiếu khí	<i>Campylobacter jejuni</i> ^d	000156 hoặc 00005	-	Định tính	Phát triển tốt (2)	Khuẩn lạc nhỏ, phẳng hoặc lồi có bề mặt bóng
				Tinh chọn lọc		<i>Campylobacter coli</i> ^d + <i>E. coli</i> ^d	00004 00012 hoặc 00013 hoặc 00179 hoặc 00090	-	Định tính	Úc chế toàn phần hoặc từng phần (0-1)	Khuẩn lạc không đặc trưng
						<i>Staphylococcus aureus</i> ^d	00032 hoặc 00034	-	Định tính	Úc chế toàn phần (0)	-
XLD	S	<i>Salmonella</i>	TCVN 9717 (ISO 19250)	Hiệu suất	(24 ± 3) h / (36 ± 2) °C	<i>Salmonella typhimurium</i> ^{d,l}	00031	-	Định tính	Phát triển bình thường (2)	Khuẩn lạc có tâm màu đen và viền trong, màu đỏ nhạt do sự thay đổi màu của môi trường
				Tinh chọn lọc		<i>Salmonella Enteritidis</i> ^{d,l}	00030				
						<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	-	Định tính	Phát triển hoặc úc chế từng phần (0-1)	Khuẩn lạc màu vàng
						<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 hoặc 00087	-	Định tính	Úc chế toàn phần (0)	-
Môi trường dùng cho nhiều mục đích											
Môi trường ^a	Typ ^b	Ví sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ù	Chủng đối chứng	Số WDCM ^c	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng	Chuẩn cứ	Các phản ứng đặc trưng
BPW ^k	L	Pha loãng để đếm tất cả vi sinh vật	TCVN 6507 (ISO 6887)	Pha loãng	45 min đến 1 h / 20 °C đến 25 °C	<i>E. coli</i> ^d	00012 hoặc 00013	TSA	Định lượng	± 30 % khuẩn lạc/T ₀ (± 30 % số đếm ban đầu)	-
		Tăng sinh sơ bộ để phát hiện <i>Salmonella</i>	TCVN 9717 (ISO 19250)	Hiệu suất	(18 ± 2) h / (36 ± 2) °C	<i>Salmonella typhimurium</i> ^{d,l} <i>Salmonella Enteritidis</i> ^d	00031 00030	-	Định tính	Độ đục (1-2) ^j	-

Bảng F.1 (kết thúc)

Môi trường đối chứng đối với số đếm vi sinh vật											
Môi trường ^a	Typ ^b	Ví sinh vật	Tiêu chuẩn	Chức năng	Ú	Chứng đối chứng	Số WDCM ^c	Môi trường đối chứng	Phương pháp kiểm chứng	Chuẩn cứ	Các phản ứng đặc trưng
BCYE	S	Đếm khuẩn lạc	ISO 11731 và ISO 111731-2	Hiệu suất	2 ngày đến 5 ngày/ (36 ± 2) °C	<i>Legionella pneumophila</i>	00107 ^b	Mè môi trường BCYE đã được đánh giá	Định lượng	$P_R \geq 0,7$	Khuẩn lạc màu trắng-xám-xanh lam-dò tia có gờ và tròn bóng đặc trưng
TSA ^d	S	Đếm khuẩn lạc	-	Hiệu suất	Theo qui định trong phương pháp mà TSA được dùng làm môi trường đối chứng	<i>E. coli</i> ^d <i>Clostridium perfringens</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	00012 00013 00090 00179 00007 00024 00087	Mè môi trường TSA đã được đánh giá	Định lượng	$P_R \geq 0,7$	Khuẩn lạc đặc trưng theo từng loài

^a Tên gọi đầy đủ của các môi trường viết tắt nêu trong Bảng E.2.

^b Các chủng được thử nghiệm ít nhất

^c Tham khảo bảng kê chủng đối chứng có sẵn trên <http://www.wfcc.info> về thông tin số lượng chủng của bộ sưu tập giống và các chi tiết liên lạc;

^d Chủng được chọn tự do, một trong các chủng được sử dụng ít nhất.

^e L: môi trường lỏng; S: môi trường đặc; SS: môi trường bán đặc

^f Phát triển/dộ đục được phân loại như sau: 0 – không phát triển/không đục; 1 – phát triển yếu/hơi đục và 2 – phát triển/có đục (xem 7.4.2.1, 8.4.1).

^g *Escherichia coli* WDCM 00013 được nêu trong tiêu chuẩn cụ thể.

^h *Escherichia coli* WDCM 00013 sinh β-d-gluconidase mạnh và WDCM 00202 sinh β-d-gluconidase yếu

ⁱ Một số quy định và hạn chế của quốc gia về sử dụng typ huyết thanh khác. Xem các yêu cầu hiện hành về việc chọn typ huyết thanh *Salmonella*.

^j Phát triển/dộ đục được xếp loại là: 0 – không phát triển/dộ đục; 1 – phát triển yếu/dộ đục; 2 – phát triển tốt/dộ đục (xem 7.4.1.2; 8.4.1).

^k Nếu môi trường BPW được sử dụng cho hai hoặc ba ứng dụng khác nhau: ít nhất là thực hiện phép thử phát triển *Salmonella* (nếu phòng thử nghiệm thực hiện thử vi sinh vật này).

^l Chọn các chủng theo phương pháp có sử dụng TSA làm môi trường đối chứng.

Bảng F.2 – Các thuật ngữ viết tắt về môi trường được sử dụng trong Bảng F.1

Thuật ngữ môi trường viết tắt	Tên đầy đủ của môi trường	Tiêu chuẩn
BCYE	Môi trường chất chiết nấm men đệm than	ISO 11731 và ISO 11731-2
Bolton	Canh thang Bolton	ISO 17995
BPW	Nước đệm pepton	TCVN 6507 (ISO 6887), TCVN 9717 (ISO 19250)
DRCM	Môi trường phân biệt bô sung clostridium	TCVN 6191-1 (ISO 6461-1)
GVPC	Thạch đệm than chất chiết nấm men bô sung glycin, vancomycin, polymyxin B, cycloheximid	ISO 11731 và ISO 11731-2
Lactose TTC	Thạch clorua triphenyltetrazolium lactose bô sung natri heptadecylsulfat	TCVN 6187-1 (ISO 9308-1)
mCCDA	Thạch deoxycholat cefoperazon than cài biển	ISO 17995
mCP	Thạch perfringen Clostridium dùng cho phương pháp lọc	98/83/EC
MUD/SF	Môi trường 4-methylumbelliferyl- α -D glucoside /SF	TCVN 6189-1 (ISO 7899-1)
MUG/EC	Môi trường 4-methylumbelliferyl- β -D glucuronide /EC	ISO 9308-3
Preston	Canh thang Preston	ISO 17995
Pseudomonas CN	Thạch axit nalidixic xetrimid Pseudomonas	TCVN 8881 (ISO 16266)
RVS	Canh thang Rappaport-Vassiliadis pepton đậu tương	TCVN 9717 (ISO 19250)
Slanetz và Bartley	Môi trường Slanetz và Bartley	TCVN 6189-2 (ISO 7899-2)
Sắt sulfit	Thạch sắt sulfit	TCVN 6191-2 (ISO 6461-2)
Tryptose sulfit (TS)	Thạch tryptose sulfit	TCVN 6191-2 (ISO 6461-2)
TSA	Thạch trypton đậu tương	–
TSC	Thạch sulfit xycloserin tryptose (không chứa lòng đồ trứng)	ISO 14189
XLD	Thạch deoxycholat lysin xylose	TCVN 9717 (ISO 19250)
YEA	Chất chiết nấm men	ISO 6222

Phụ lục G

(Quy định)

**Sử dụng các biểu đồ kiểm chứng để kiểm soát phép thử định lượng
môi trường nuôi cấy đặc**

G.1 Yêu cầu chung

Phụ lục này mô tả việc sử dụng biểu đồ kiểm chứng để theo dõi các kết quả, đặc biệt là kết quả biểu thị tỷ lệ hiệu suất, P_R , như chi tiết trong 7.2, khi thử nghiệm thạch chọn lọc hoặc không chọn lọc dựa vào thạch đối chứng không chọn lọc hoặc các mẻ thạch chọn lọc tương tự đã được chấp nhận.

Cần chú ý khi sử dụng biểu đồ kiểm chứng để thử nghiệm giữa các mẻ của cùng loại thạch, như bất kỳ sự suy giảm chất lượng nào của các mẻ liên tiếp có thể không được rõ ràng, trừ khi các dung dịch huyền phù thử nghiệm được kiểm chứng cẩn thận để cho số lượng sinh vật thích hợp, hoặc sử dụng RM (xem 3.4.6). Bất kỳ hệ thống kiểm soát chất lượng môi trường nào dựa vào việc kiểm tra giữa các mẻ phải được xác nhận là phù hợp với mục đích trước khi đưa vào sử dụng.

Mỗi nguồn gốc và mẻ thạch thử nghiệm đều cho thấy mức độ khác nhau về hiệu suất và các phòng thử nghiệm riêng rẽ có thể sử dụng các thạch đối chứng khác nhau để so sánh với thạch thử nghiệm. Do đó, các phòng thử nghiệm riêng rẽ phải thiết lập và chứng minh các giới hạn của mình và/hoặc khoảng hệ số hiệu suất có thể được chấp nhận đối với mỗi loại thạch thử nghiệm sử dụng thường xuyên trong khoảng giá trị hệ số hiệu suất quy định trong 7.2.2.1.2. Các biểu đồ kiểm chứng được chuẩn bị từ các dữ liệu đánh giá xác nhận ban đầu, thiết lập các giới hạn chấp nhận sử dụng phân tích thống kê và sau đó các biểu đồ này được sử dụng để theo dõi các mẻ thạch tiếp theo. Thường xuyên đánh giá các giới hạn (ví dụ cứ sau mỗi 30 phép thử) và điều chỉnh khi cần (thông tin bổ sung được đưa ra trong G.2.6).

Các quy trình yêu cầu sử dụng dung dịch huyền phù vi sinh vật có nồng độ đã biết của chủng đích quy định cho môi trường thử nghiệm nêu trong Phụ lục E hoặc Phụ lục F; đây là giá trị đích đối với phép thử. Huyền phù thử nghiệm là RM thương mại (xem 3.4.6) hoặc được phòng thử nghiệm chuẩn bị từ các giống làm việc đã chuẩn hóa kỹ của các chủng đối chứng. Nồng độ vi sinh vật trong huyền phù phòng thử nghiệm (giá trị đích) phải cho thấy ổn định và đồng nhất trong suốt thời gian sử dụng.

Để tối ưu hóa việc kiểm soát, các huyền phù phải chứa xấp xỉ 100 cfu (khoảng 80 cfu tới 120 cfu) trong một thể tích dịch cấy được đưa lên đĩa thạch và thường thực hiện các phép thử ít nhất hai lần lặp lại. Bảng 1 (xem 5.4.2.5.1) cung cấp các giá trị về độ chụm ở các nồng độ dịch cấy khác nhau cho thấy tầm quan trọng của việc duy trì dịch cấy tối ưu này.

Các đĩa thạch phải được cấy bằng các kỹ thuật dàn bè mặt, đỗ đĩa hoặc lọc màng, thích hợp với phương pháp chuẩn đối chứng mà thạch được sử dụng và được ủ trong các điều kiện quy định tại các tiêu chuẩn cụ thể đó.

Các khuẩn lạc có mặt trên hoặc trong mỗi đĩa phải được đếm phù hợp với các phương pháp chuẩn đối chứng và các hệ số hiệu suất tính được trong 7.2.1.1.

G.2 Sử dụng biểu đồ kiểm chứng

G.2.1 Yêu cầu chung

Để thiết lập một biểu đồ kiểm chứng mới, cần thực hiện ít nhất 10 phép thử trên các mẻ khác nhau của cùng loại thạch thử nghiệm, tốt nhất là thực hiện lặp lại hai lần và vào những ngày khác nhau do các người khác nhau thực hiện (các điều kiện tái lập nội phòng thử nghiệm). Sử dụng 20 phép thử (như trong G.2.2) sẽ cho giới hạn đáng tin cậy hơn so với biểu đồ được chuẩn bị từ 10 phép thử ban đầu (số lượng tối thiểu) phải được tính lại khi có sẵn 20 kết quả. Phải duy trì các biểu đồ riêng rẽ theo một dây ít nhất 30 phép thử được giữ lại cho mỗi đánh giá chất lượng môi trường (xem G.2.6).

G.2.2 Dụng biểu đồ kiểm chứng

Quy trình này dựa trên dịch cấy chuẩn có chứa (100 ± 20) cfu trong 0,1 ml dịch cấy được sử dụng đối với phép thử sử dụng kỹ thuật dàn đĩa quy trình này. Cũng thích hợp khi sử dụng các thể tích khác của dịch cấy đối với các kỹ thuật khác như đỗ đĩa hoặc lọc màng, với điều kiện là dịch cấy có chứa số lượng khuẩn lạc nằm trong dải chấp nhận (100 ± 20) cfu.

Trung bình của hai dây số đếm lặp lại trên phép thử thứ i là x_i cfu/0,1 ml đổi với môi trường thử nghiệm và y_i cfu/0,1 ml đổi với môi trường đối chứng. Khi đó, hệ số hiệu suất của phép thử thứ i là $x_i / y_i = r_i$. Đối với các dây phép thử từ $i = 1, 2, \dots, n$, trong đó n là số tối thiểu 10 và tối đa 20, sử dụng Công thức (G.1) để tính giá trị trung bình, \bar{r} của P_R :

$$\bar{r} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n r_i = \frac{r_1 + r_2 + r_3 + \dots + r_n}{n} \quad (G.1)$$

Sử dụng Công thức (G.2) để xác định các giá trị trung bình, \bar{R} của P_R :

$$\bar{R} = \frac{1}{(n-1)} \sum_{i=2}^n |r_i - \bar{r}_{i-1}| \quad (G.2)$$

Trong đó:

i là số phép thử;

n là tổng số các phép thử;

r_i là giá trị P_R thứ i .

Xác định các độ lệch chuẩn (s) như sau:

$$s = 0,8865 \times \bar{R} = \frac{\bar{R}}{1,128} \quad (\text{G.3})$$

CHÚ THÍCH: Hằng số 0,8865 (hoặc nghịch đảo của 1,128) là chuẩn được ASTM khuyến cáo để xác định độ lệch chuẩn từ dải trung bình các giá trị thử nghiệm lặp lại hai lần.

Tính các giá trị giới hạn 95 % ($\pm 2s$) và 99 % ($\pm 3s$) của sự phân bố các kết quả.

Trên trục Y của biểu đồ kiểm chứng, đánh dấu các vị trí của giá trị trung bình tổng thể P_R , \bar{r} , từng giá trị của hai giá trị trên ($+2s$ và $+3s$) và hai giá trị dưới ($-2s$ và $-3s$), sau đó vẽ các đường song song với trục X. Dụng các giá trị P_R thứ 1, 2, ..., n trên trục X (xem ví dụ).

Mỗi khi chuẩn bị mè môi trường mới, cần thử nghiệm sử dụng huyền phù dịch cây chuẩn và P_R tính được từ tỷ số của số cfu đếm được sau khi ủ ấm trên môi trường thử nghiệm và môi trường đối chứng như trên. Giá trị này được vẽ trên biểu đồ kiểm chứng và được kiểm tra lại dựa vào các giới hạn thu được.

G.2.3 Ví dụ về dụng biểu đồ kiểm chứng sử dụng 20 kết quả

Bảng G.1 cho các kết quả từ 20 lần kiểm tra hệ số hiệu suất liên tiếp trên các mè của cuồng loại thạch thử nghiệm không chọn lọc sử dụng dịch cây chuẩn 110 cfu/0,1 ml đếm được trên môi trường đối chứng không chọn lọc (số đếm chính xác trên môi trường đối chứng sẽ khác so với số đếm được trong thực tế, nhưng số liệu được dùng để đưa ra nguyên tắc của biểu đồ kiểm chứng là chỉ từ các hệ số hiệu suất tính được).

Bảng G.1 – Báo cáo kiểm tra hệ số hiệu suất của 20 lần liên tiếp trên thạch không chọn lọc dùng để xây dựng biểu đồ kiểm chứng (cho các số đếm thực chỉ trên môi trường thạch thử nghiệm, các số đếm trên môi trường đối chứng y_i là 110 cfu)

$i =$	Kết quả số phép thử nghiệm (i)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cfu (thạch thử nghiệm - x_i)	95	102	94	97	105	68	98	105	103	116
r_i	0,86	0,93	0,85	0,88	0,95	0,62	0,89	0,95	0,95	1,05
$ r_i - r_{i-1} $	–	0,07	0,08	0,03	0,07	–	0,06	0,06	0,01	0,11
$i =$	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Cfu (thạch thử nghiệm - x_i)	95	90	89	116	114	110	114	98	88	102
r_i	0,86	0,82	0,81	1,05	1,04	1,00	1,04	0,89	0,80	0,93
$ r_i - r_{i-1} $	0,19	0,04	0,01	0,24	0,01	0,04	0,04	0,15	0,09	0,13

Cần lưu ý rằng kết quả dưới của phép thử số 6 trong ví dụ này của thạch không chọn lọc thấp hơn khoảng cho phép đối với giá trị chấp nhận P_R từ 0,70 đến 1,40 của thạch không chọn lọc (xem 7.2.2.1.2) và tất cả các kết quả như thế được coi là ngoại lệ trong việc thu lấy độ lệch chuẩn và giá trị trung bình đối với biểu đồ kiểm chứng.

Các lý do kết quả thử nghiệm PR nằm ngoài dải cho phép cần được nghiên cứu vì chúng thường liên quan đến việc thực hiện không tốt quy trình thử nghiệm chứ không phải do chất lượng môi trường kém và thường tìm được khi dịch cấy được sử dụng nằm ngoài khoảng độ chum quy định từ 80 cfu đến 120 cfu.

Giá trị P_R trung bình bằng với:

$$\bar{r} = \sum r_i / n = (0,86 + 0,93 + 0,85 + \dots + 0,80 + 0,93) / 19 = 17,5 / 19 = 0,92 \quad (\text{G.4})$$

(thể hiện bằng đường kẻ đậm trên Hình G.1)

Khoảng các giá trị ($R = |r_i - r_{i-1}|$) được xác định là chênh lệch tuyệt đối của các giá trị liên tiếp, ngoại trừ giá trị bị loại (ví dụ: phép thử số 6 trong Bảng G.1 ở trên), nghĩa là:

$$0,93 - 0,86 = 0,07; \quad 0,93 - 0,85 = 0,08; \quad 0,88 - 0,85 = 0,03 \text{ v.v...}$$

Giá trị trung bình bằng:

$$\bar{R} = \sum R_i / (n-1) = (0,07 + 0,08 + 0,03 + \dots + 0,09 + 0,13) / 18 = 1,43 / 18 = 0,08 \quad (\text{G.5})$$

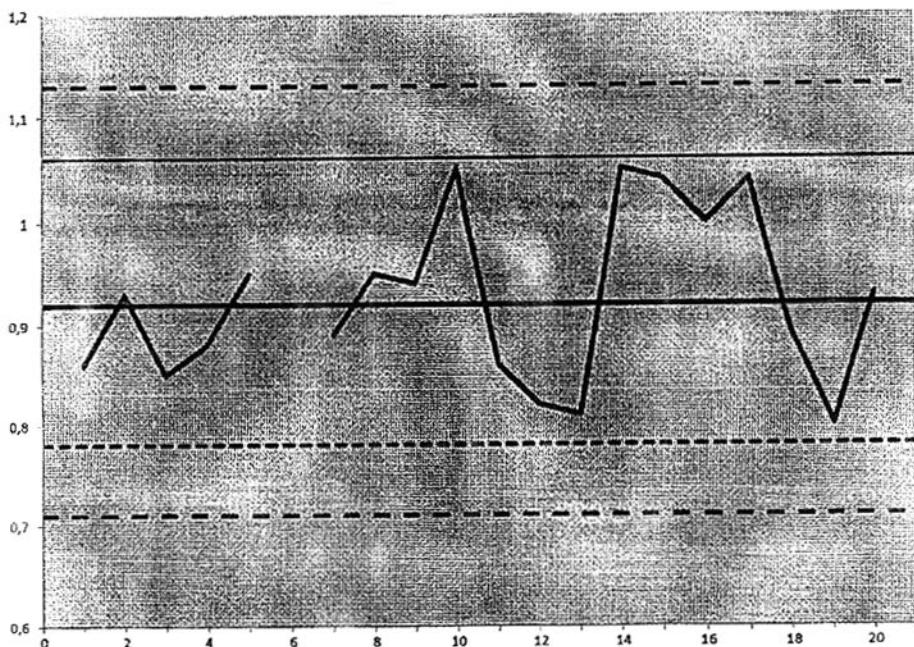
Do đó, độ lệch chuẩn, $s = 0,8865 \times 0,08 = 0,071$

Các giới hạn tin cậy 95 % (thể hiện bằng đường kẻ chấm nhạt trong Hình G.1) là:

$$0,92 \pm 2 \times 0,071 = 0,92 \pm 0,14 = 0,78 \text{ đến } 1,06 \quad (\text{G.6})$$

Các giới hạn tin cậy 99 % (thể hiện bằng đường kẻ chấm đậm trong Hình G.1) là:

$$0,92 \pm 3 \times 0,071 = 0,92 \pm 0,21 = 0,78 \text{ đến } 1,13 \quad (\text{G.7})$$



CHÚ DẶN:

Y hệ số hiệu suất, P_R

X số phép thử

Hình G.1 – Biểu đồ kiểm chứng được xây dựng từ các hệ số hiệu suất thu được từ 20 lần kiểm tra đầu tiên nêu trong Bảng G.1 (đã loại trừ kết quả ngoại lệ số 6)

G.2.4 Đánh giá hiệu năng và giải thích kết quả

Mô mô trường nuôi cấy sẽ được chấp nhận nếu các tiêu chí chất lượng vi sinh lần tiêm chung (xem 6.2) đều đáp ứng.

Mô mô trường mới bị loại bỏ nếu các kết quả sau đây xuất phát từ các phép thử định lượng nói trên không kiểm soát được như sau:

- vi phạm giới hạn $\pm 3s$;
- hai trong ba quan sát trong hàng ngang vượt quá giới hạn cảnh báo $\pm 2s$;
- sáu quan sát trong hàng ngang là tăng đều hoặc giảm đều;
- chín quan sát trong hàng ngang trên cùng một bên của giá trị trung bình.

CHÚ THÍCH: Tiêu chí của bốn quan sát trong hàng ngang vượt quá mức $\pm 1s$ cũng cho thấy có vấn đề.

G.2.5 Các cách tiếp cận khác để thử hiệu năng của môi trường

Quy trình sử dụng biểu đồ kiểm chứng để thử hiệu năng của môi trường nếu trên thu được để dụng đồ thị các giá trị P_R mà không cần chuyển \log_{10} của số đếm khuẩn lạc.

Những phương pháp thay được chấp nhận dựa trên đồ thị trực tiếp các số đếm khuẩn lạc hoặc số đếm khuẩn lạc chuyển về \log_{10} , nếu cho thấy thích hợp. Các phương pháp kiểm tra xem sự phân bố dữ liệu số đếm khuẩn lạc có phù hợp với phân bố chuẩn hay không khi không chuyển về \log_{10} sử dụng phép thử Kolmogorov-Smirnov hoặc phép thử khí-bình phương, các ví dụ được đưa ra trong NEN 6603. [39]

Tuy nhiên, cần lưu ý rằng nếu các số đếm không bao gồm hệ số pha loãng, khi đó không chắc biến đổi về \log_{10} sẽ là thích hợp. Việc chuyển đổi trực tiếp số đếm (ví dụ 100 cfu/đĩa) cần giả định phân bố Poisson để chuyển đổi số đếm x là \sqrt{x} . Ngoài ra, trong tình huống bất kỳ khi số đếm khuẩn lạc được dụng đồ thị trực tiếp thì cần đảm bảo rằng mức dịch cấy thử nghiệm là không đổi giữa các phép thử, nếu không kết quả thu được sẽ bị sai.

G.2.6 Xem xét định kỳ các biểu đồ kiểm chứng

Các biểu đồ kiểm chứng đầu tiên và tiếp theo đối với một môi trường thử nghiệm phải được xem xét định kỳ để đảm bảo rằng các giới hạn thiết lập vẫn còn chấp nhận được. Biểu đồ đầu tiên chứa tối thiểu là 20 điểm dữ liệu được xem xét để thiết lập giới hạn ban đầu và sau đó các biểu đồ tiếp theo có thể được xem xét tại các tần suất dự kiến cho mỗi 30 điểm dữ liệu bằng các quy trình dưới đây.

Một khi biểu đồ kiểm chứng được hoàn tất, tính lại giá trị trung bình và độ lệch chuẩn s , bỏ qua mọi kết quả nằm ngoài dài chấp nhận hoặc giới hạn thiết lập. Trường hợp sử dụng việc chuyển đổi về \log_{10} , thì thực hiện tất cả các phép tính sử dụng kết quả chuyển đổi \log_{10} .

So sánh độ lệch chuẩn của biểu đồ hiện hành với độ lệch chuẩn của tất cả các kết quả trước đó, s_{tot} , và kiểm tra biến thiên sử dụng các tiêu chí sau đây:

$$\frac{s^2}{s_{tot}^2} < F(0,975; n - 1, n_{tot} - 1) \quad (G.8)$$

Trong đó: $F(0,975; n - 1, n_{tot} - 1)$ là giá trị của thử nghiệm F ở xác suất $\alpha = 0,025$ tại quan sát thử n của s và quan sát n_{tot} của s_{tot} .

Biến thiên đã tăng đáng kể khi s không đáp ứng được tiêu chí này và cần tìm nguyên nhân.

Trường hợp độ lệch chuẩn của biểu đồ kiểm chứng đáp ứng được các tiêu chí, thì kết hợp với biểu đồ kiểm chứng tiếp theo [xem công thức (G.9) là ví dụ để tính toán].

Đồng thời so sánh giá trị trung bình, \bar{x} của biều đồ hiện hành với trung bình của tất cả các quan sát trước đó, \bar{x}_{tot} và thử nghiệm sử dụng tiêu chí sau:

$$|\bar{x} - \bar{x}_{tot}| < 2\sqrt{\frac{s^2}{n} + \frac{s_{tot}^2}{n_{tot}}} \quad (G.9)$$

Trong đó:

\bar{x} là giá trị trung bình của biều đồ kiểm chứng hiện hành;

\bar{x}_{tot} là giá trị trung bình của tất cả các biều đồ kiểm chứng trước đó;

s là độ lệch chuẩn của biều đồ kiểm chứng;

s_{tot} là độ lệch chuẩn của tất cả các biều đồ kiểm chứng trước đó;

n là tổng số quan sát của biều đồ kiểm chứng hiện hành;

n_{tot} là tổng số quan sát của tất cả các biều đồ kiểm chứng trước đó.

Nếu trung bình của biều đồ kiểm chứng hiện hành đáp ứng các tiêu chí thì kết hợp dữ liệu với các quan sát trước đó với cho biều đồ kiểm chứng tiếp theo.

Bắt đầu điều tra về nguyên nhân có thể xảy ra nếu các tiêu chí không được đáp ứng. Nếu không tìm ra nguyên nhân, thì bắt đầu dựng biều đồ kiểm chứng mới và thiết lập các giới hạn mới dựa trên những quan sát trước đây bằng cách tính toán lại các giới hạn từ giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của tất cả các quan sát.

VÍ DỤ: Ví dụ về tính toán:

Các ví dụ về dữ liệu như trong Bảng G2, dựa vào ba biều đồ kiểm chứng, mỗi biều đồ có 30 quan sát x_{tot} , s_{tot} và s_{tot}^2 liên quan đến số liệu tổng hợp từ biều đồ 1 và biều đồ 2.

Một trong những quan sát trong biều đồ thứ hai (số 22 được đánh dấu bằng chữ in nghiêng) vượt quá giới hạn chấp nhận được phòng thử nghiệm thiết lập từ dữ liệu của mình và quan sát này là do đó không được sử dụng trong việc tính toán.

**Bảng G.2 – Dữ liệu đối với 3 biều đồ kiểm chứng để đánh giá dựa vào các giới hạn
đã thiết lập bởi phòng thử nghiệm (từ NEN 6603[39])**

Phép đo	Kết quả thử nghiệm									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Biểu đồ 1	100	77	108	75	83	92	70	81	90	88
Biểu đồ 2	74	81	60	66	109	83	73	82	74	89
Biểu đồ 3	89	75	67	63	90	77	90	75	53	91
Phép đo	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Biểu đồ 1	78	82	90	95	75	86	100	98	75	92
Biểu đồ 2	80	83	95	71	98	74	76	92	84	88
Biểu đồ 3	99	74	88	68	100	81	97	89	80	71
Phép đo	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Biểu đồ 1	74	80	98	79	82	91	78	90	65	60
Biểu đồ 2	67	130	97	98	64	85	101	73	67	82
Biểu đồ 3	63	84	82	84	99	79	86	70	72	98
Tính các số liệu biểu đồ riêng rẽ										
	\bar{x}	s	s^2			x_{tot}	s_{tot}	s_{tot}^2	Từ các số liệu tổng hợp của biểu đồ 1 và biểu đồ 2	
Biểu đồ 1	84,4	11,1	122,7			83,0	11,7	136,1		
Biểu đồ 2	81,6	12,3	150,8			-	-	-		
Biểu đồ 3	81,1	12,1	147,5			-	-	-		

Kiểm tra về biến thiên trong độ lệch chuẩn bằng cách so sánh độ lệch chuẩn, s, của biều đồ cuối cùng (biểu đồ 3) với độ lệch chuẩn của hai biều đồ đầu tiên (s_{tot}) như quy định trên đây để cho kết quả sau:

$$\frac{s^2}{s_{tot}^2} = \frac{147,5}{136,1} = 1,084 \quad (\text{G.10})$$

Giá trị tới hạn là $F(0,975; 29,58) = 1,83$. Giá trị quan sát được này là nhỏ hơn giá trị tới hạn cho nên không có sự chênh lệch đáng kể giữa độ lệch chuẩn từ Biểu đồ 3 với hai biều đồ trước đó (Biểu đồ 1 và Biểu đồ 2).

Sau đó kiểm tra nếu giá trị trung bình đã thay đổi như mô tả ở trên đối với các dữ liệu cho các kết quả như sau:

Dữ liệu đối với Biểu đồ 3 cho $|81,1 - 83,0| = 1,9$ và giá trị tới hạn cho:

$$2\sqrt{\frac{147,5}{30} + \frac{136,1}{59}} = 5,4 \quad (\text{G.11})$$

Giá trị tính được đối với Biểu đồ 3 là nhỏ hơn giá trị tối hạn do đó không có sự chênh lệch đáng kể giữa trung bình của Biểu đồ 3 với các biểu đồ trước đó (Biểu đồ 1 và Biểu đồ 2).

Khi thử nghiệm về biến thiên có hiệu lực, thì các dữ liệu từ Biểu đồ 3 được kết hợp với dữ liệu của các biểu đồ trước đó để tính các giới hạn mới. Như vậy, các biểu đồ mới được thực hiện trên cơ sở của giá trị trung bình 82,4 và độ lệch chuẩn 11,80.

Phụ lục H

(Tham khảo)

Đảm bảo chất lượng của môi trường nuôi cấy – Xử lý sự cố**Bảng H.1**

Bất thường	Lý do có thể
Môi trường thạch không đồng đặc	Quá nhiệt trong quá trình chuẩn bị môi trường Độ pH thấp gây ra thủy phân axit Sử dụng khối lượng thạch không đúng Agar không hòa trộn kỹ Trộn các thành phần không kỹ
Độ pH không đúng	Quá nhiệt trong quá trình chuẩn bị môi trường Chất lượng nước kém Nhiễm bẩn hóa chất từ bên ngoài pH được đo tại nhiệt độ không chính xác Máy đo pH được hiệu chuẩn không đúng Chất lượng môi trường khô không tốt
Màu sắc khác thường	Quá nhiệt trong quá trình chuẩn bị môi trường Chất lượng nước kém Chất lượng môi trường khô không tốt Thiếu một hay nhiều thành phần Các thành phần được sử dụng không chính xác Độ pH không chính xác Nhiễm bẩn từ bên ngoài
Hình thành kết tủa	Quá nhiệt trong quá trình chuẩn bị môi trường Chất lượng nước kém Chất lượng môi trường khô không tốt Kiểm soát pH kém Nếu môi trường được chuẩn bị từ các thành phần riêng lẻ, thì có thể có tạp chất trong nguyên liệu
Môi trường bị ức chế/Hiệu suất thấp	Quá nhiệt trong quá trình chuẩn bị môi trường Chất lượng môi trường khô không tốt Chất lượng nước kém Công thức được sử dụng không đúng, ví dụ: các thành phần được cân không chính xác, chất bổ sung có nồng độ không đúng Có dư lượng chất độc hại trong bình chuẩn bị hoặc trong nước Chuẩn bị các vi sinh vật kiểm soát sinh vật không đúng cách
Tính chọn lọc/tính đặc hiệu kém	Quá nhiệt trong quá trình chuẩn bị môi trường Chất lượng môi trường khô không tốt Sử dụng công thức không đúng Chất bổ sung được thêm vào không đúng cách, ví dụ: cho vào khi môi trường quá nóng hoặc với nồng độ không đúng Chất bổ sung bị nhiễm bẩn Chuẩn bị các vi sinh vật kiểm soát sinh vật không đúng cách
Nhiễm bẩn	Khử trùng không đúng cách Kỹ thuật vô trùng kém Chất bổ sung bị nhiễm bẩn

Phụ lục I
(Tham khảo)

Phép thử định lượng môi trường nuôi cấy lỏng

I.1 Yêu cầu chung

Phụ lục này đưa ra các phương pháp thử định lượng môi trường lỏng, có thể cung cấp thêm thông tin so với các phương pháp thông thường quy định trong Điều 8. Các phương pháp này chủ yếu được áp dụng để đánh giá môi trường đang được nghiên cứu và so sánh.

Chất lượng của môi trường lỏng với khía cạnh tối ưu hóa đặc tính phát triển được thể hiện rõ nhất trong giai đoạn đầu. Nhìn vào độ dài của pha trễ và tăng trưởng trong pha đầu cung cấp thông tin nhạy cảm nhất về hiệu suất và tính chọn lọc của các vi sinh vật đích và không phải đích tương ứng trong canh thang thử nghiệm và canh thang đối chứng. Do đó, nếu chỉ có khác biệt nhỏ về chất lượng, thì cấy vạch từ môi trường lỏng vào các đĩa sau thời gian ngắn hơn, ví dụ: 6 h hoặc 12 h.

I.2 Phương pháp thử định lượng môi trường nuôi cấy lỏng không chọn lọc sử dụng các vi sinh vật đích

I.2.1 Cách tiến hành

- Chọn một lượng các ống, mỗi ống chứa ít nhất 10 ml môi trường hoặc các phần 10 ml từ mỗi mẻ cần thử nghiệm (xem 3.1.2).
- Sử dụng giống làm việc nêu trong 5.4.2.2.
- Nuôi cấy các vi sinh vật đích: Cấy canh thang thử nghiệm và môi trường đối chứng đặc cho mỗi vi sinh vật thử nghiệm ≤ 100 tế bào.
- Ủ các môi trường đã cấy theo các điều kiện quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể.
- Chuẩn bị đủ các độ pha loãng từ môi trường đã ủ ám để thu được số đếm khuẩn lạc (xem 5.4.2.5).
- Dàn đều thể tích đã đong, ví dụ 10 µl, trên một đĩa thạch không có chất ức chế như trong 7.2.2.1.1.

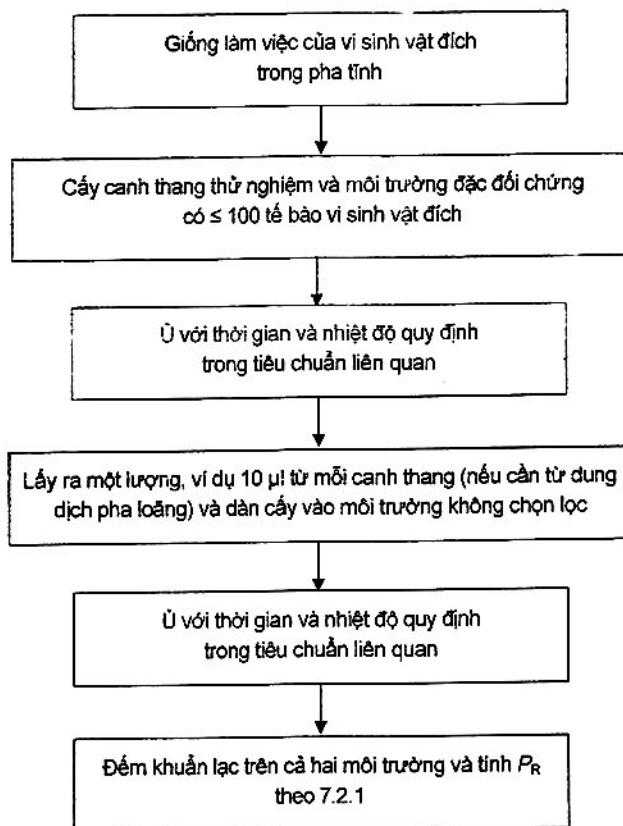
I.2.2 Đếm và diễn giải kết quả

Sau khi ủ, đếm số khuẩn lạc trên các đĩa (xem 7.2.2.1.1 và 7.2.2.1.2). Việc diễn giải các kết quả sẽ phụ thuộc vào mục tiêu của phép thử, ví dụ: so với mě trước đó, môi trường đối chứng hoặc RM.

Vi sinh vật đích cần đạt được 10^6 cfu/ml đến 10^8 cfu/ml.

I.2.3 Sơ đồ phương pháp định lượng đối với môi trường nuôi cấy lỏng không chọn lọc sử dụng vi sinh vật đích

Hình I.1 là sơ đồ phương pháp định lượng đối với môi trường nuôi cấy lỏng không chọn lọc sử dụng các vi sinh vật đích.



Hình I.1 – Sơ đồ phép thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy lỏng không chọn lọc sử dụng các vi sinh vật đích (xem I.2.1 và I.2.2)

I.3 Phương pháp thử định lượng môi trường nuôi cấy lỏng chọn lọc sử dụng vi sinh vật đích và không phải đích

I.3.1 Cách tiến hành

- Chọn một lượng các ống, mỗi ống chứa ít nhất 10 ml môi trường hoặc các phần 10 ml từ mỗi mẻ cần thử nghiệm (xem 3.2.2).
- Sử dụng giống làm việc nêu trong 5.4.2.

- Nuôi cấy các vi sinh vật đích: cấy canh thang thử nghiệm, canh thang đối chứng và môi trường đối chứng đặc cho mỗi vi sinh vật thử nghiệm ≤ 100 tế bào. Môi trường đối chứng đặc được dùng để đếm cfu trong dịch cấy.
- Nuôi cấy các vi sinh vật không phải đích: Cấy canh thang thử nghiệm, canh thang đối chứng và môi trường đối chứng đặc cho mỗi vi sinh vật thử nghiệm $\geq 1\,000$ tế bào.
- Nuôi cấy hỗn hợp của các vi sinh vật đích và các vi sinh vật không phải đích: Để thử nghiệm các giống hỗn hợp trong canh thang thử nghiệm nuôi cấy môi trường chọn lọc, môi trường đối chứng và môi trường đối chứng đặc có ≤ 100 tế bào vi sinh vật đích và $\geq 1\,000$ tế bào của vi sinh vật không phải đích trong cùng một ống/trên cùng một đĩa thạch. Để thử nghiệm các giống hỗn hợp, cần đều khi có thể trên các đĩa thạch không chọn lọc thạch cho phép phân biệt các vi sinh vật trong giống hỗn hợp (ví dụ: đĩa đếm thạch có MUG để đếm *Escherichia coli* và *Salmonella* spp.). Khi không thể phân biệt được giống cấy hỗn hợp trên môi trường thạch không chọn lọc, thì cần sử dụng môi trường thạch chọn lọc đã được thử hiệu năng.
- Ư các môi trường đã cấy theo các điều kiện quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể.

Lấy một lượng đã biết hoặc cần, lấy một lượng sau khi pha loãng từ mỗi canh thang và dàn đều lên đĩa thạch không có chất ức chế đối với các ống chỉ chứa các vi sinh vật đích hoặc chỉ chứa các vi sinh vật không phải đích nêu trong 8.2.2. Đối với các ống chứa cả vi sinh vật đích lẫn vi sinh vật không phải đích, dàn đều trên mỗi đĩa chứa cùng môi trường chọn lọc như đã sử dụng ở trên.

Phương pháp nhỏ giọt bè mặt Miles-Misra, các hệ thống nhỏ giọt khác hoặc đĩa xoắn cũng có thể được sử dụng để thu được số đếm khuẩn lạc trên các đĩa.

I.3.2 Đọc, tính và diễn giải kết quả

Đếm các khuẩn lạc của vi sinh vật đích và không phải đích trên từng đĩa và tính toán độ thu hồi so với canh thang đối chứng, có tính đến độ pha loãng được dùng để đếm (nếu cần). Trong trường hợp các giống cấy hỗn hợp, cần phân biệt các loại khác nhau.

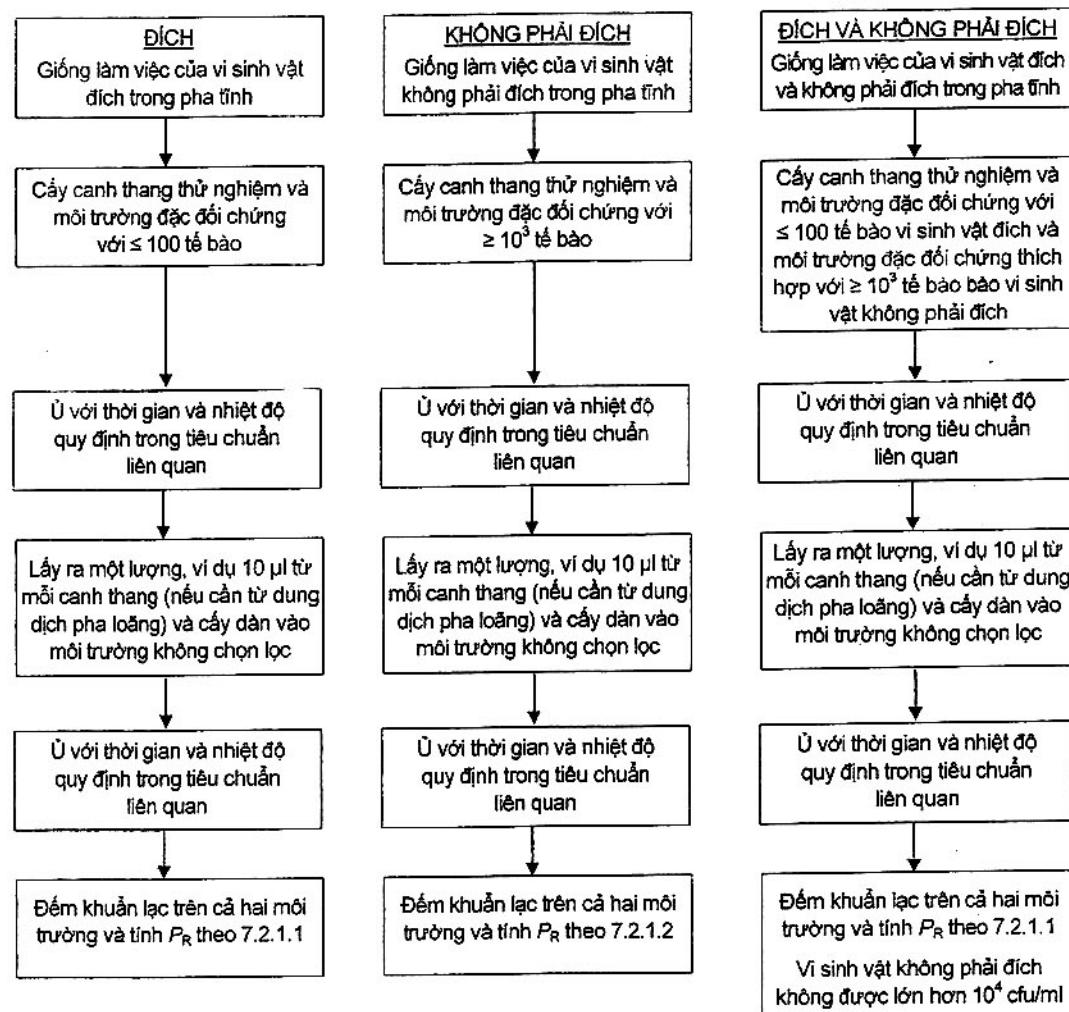
Việc tính toán và diễn giải kết quả phụ thuộc vào mục đích của phép thử. Việc diễn giải các kết quả phụ thuộc vào mục đích của phép thử, ví dụ: so sánh với mě trước đó, môi trường đối chứng hoặc RM.

Vi sinh vật đích cần đạt được 10^6 cfu/ml đến 10^8 cfu/ml và cần có mặt vi sinh vật ư thế trong môi trường chọn lọc.

Đối với các giống cấy hỗn hợp, độ thu hồi vi sinh vật đích không được thấp hơn so với độ thu hồi của giống thuần của sinh vật đích.

I.3.3 Sơ đồ phương pháp định lượng đối với môi trường nuôi cấy lỏng có chọn lọc bằng cách sử dụng vi sinh vật đích và vi sinh vật không phải đích

Hình I.2 là sơ đồ phương pháp định lượng đối với môi trường nuôi cấy lỏng chọn lọc sử dụng vi sinh vật đích và vi sinh vật không phải đích.



Hình I.2 – Sơ đồ phương pháp định lượng đối với môi trường nuôi cấy lỏng chọn lọc sử dụng vi sinh vật đích và vi sinh vật không phải đích (xem I.3.1 và I.3.2)

Phụ lục J

(Quy định)

Xác định các phép thử hiệu năng vi sinh vật đối với môi trường nuôi cấy chuẩn hóa**J.1 Khái quát**

Phụ lục này đưa ra các hướng dẫn cho các nhà lãnh đạo nhóm công tác tiêu chuẩn hóa để họ xác định các tiêu chí hiệu năng vi sinh, các phương pháp và các chứng kiểm chứng, khi xây dựng hoặc soát xét các tiêu chuẩn về phân tích vi sinh vật (vi sinh vật trong thực phẩm hoặc vi sinh vật trong nước).

J.2 Yêu cầu chung

Các yêu cầu về hiệu năng vi sinh vật (tiêu chí hiệu năng, phương pháp kiểm chứng và các mục đích) có thể áp dụng cho các môi trường nuôi cấy chuẩn hóa phải bao gồm trong mỗi tiêu chuẩn phân tích vi sinh.

Các yêu cầu về hiệu năng có thể là:

- được sử dụng và được cải biến nếu cần, theo tiêu chuẩn này đối với các môi trường nuôi cấy có quy định trong tiêu chuẩn;
- hoặc tạo ra môi trường nuôi cấy mới bất kỳ, phù hợp với các nguyên tắc quy định trong phụ lục này.

CHÚ THÍCH: Việc xác định các yêu cầu hiệu năng của vi sinh vật này không đề cập đến thuốc thử hoặc môi trường để khẳng định.

J.3 Tiêu chí hiệu năng, phương pháp và các mục đích

Các tiêu chí được đánh giá (hiệu suất, tính chọn lọc, tính đặc hiệu), các phương pháp thử được sử dụng (phương pháp định lượng và định tính) và các mục đích cần đáp ứng phải được xác định theo các đặc trưng của từng môi trường nuôi cấy, như trong Bảng J.1 dưới đây:

- dạng môi trường (canh thang, thạch);
- thành phần môi trường (môi trường chọn lọc, môi trường không chọn lọc);
- chức năng của môi trường trong phương pháp chuẩn hóa (tăng sinh, pha loãng, phát hiện, định lượng).

Bảng J.1 – Tiêu chí, phương pháp thử và mục đích

Môi trường	Tiêu chí và phương pháp thử
Canh thang định lượng chọn lọc	Hiệu suất (phương pháp: định lượng) ^a Tính chọn lọc (định tính) ^f
Thạch định lượng chọn lọc	Hiệu suất (phương pháp: định lượng) ^b Tính chọn lọc (định tính) ^g Tính đặc hiệu (định tính) ^l

Bảng J.1 (kết thúc)

Môi trường	Tiêu chí và phương pháp thử
Canh thang tăng sinh chọn lọc	Hiệu suất (phương pháp: định lượng) ^c Tính chọn lọc (định tính) ^h
Thạch phát hiện chọn lọc	Hiệu suất (phương pháp: định tính) ^d Tính chọn lọc (định tính) ^g Tính đặc hiệu (định tính) ⁱ
Thạch định lượng không chọn lọc	Hiệu suất (phương pháp: định lượng) ^b
Canh thang tăng sinh không chọn lọc	Hiệu suất (phương pháp: định tính) ^a
Canh thang pha loãng không chọn lọc	Hiệu suất (phương pháp: định lượng) ^e
Thạch phát hiện không chọn lọc	Hiệu suất (phương pháp: định tính) ^d
1. Hiệu suất: mục đích của tiêu chí hiệu năng này là để kiểm tra xác nhận sự phát triển của các chủng đích (và hình thái khuẩn lạc) trên đĩa thạch.	
^a Hiệu suất định tính (môi trường lỏng): xem 8.4.	
Mục đích: kết quả phải là 2 (tăng trưởng khả quan) đối với một dịch cấy ≤ 100 cfu các vi sinh vật đích (8.4.1).	
^b Hiệu suất định lượng (môi trường thạch): xem 7.2.1.1.	
– Mục đích: P_R phải ≥ 0,50 để so sánh môi trường chọn lọc với môi trường đối chứng không chọn lọc quy định trong các Phụ lục F và E. Các P_R phải ≥ 0,70 để so sánh môi trường không chọn lọc với môi trường đối chứng không chọn lọc hoặc theo quy định trong tiêu chuẩn hoặc các Phụ lục F và E. Điều này cũng áp dụng cho các trường hợp đặc biệt, nếu thực hiện so sánh với mě trước đó.	
Các khuẩn lạc vi sinh vật đích phải có vẻ bên ngoài đặc trưng.	
^c Định tính (môi trường lỏng): xem 8.3.	
Mục đích: ít nhất 10 khuẩn lạc của vi sinh vật đích quan sát thấy trên môi trường phân lập chọn lọc được sử dụng để phát hiện sau khi cấy ≤ 100 cfu.	
^d Hiệu suất định tính (môi trường thạch): xem 7.4.	
Mục đích: kết quả phải là 2 (tăng trưởng khả quan) các vi sinh vật đích.	
Các khuẩn lạc vi sinh vật đích phải có vẻ bên ngoài đặc trưng.	
^e Hiệu suất định lượng (môi trường lỏng): xem 8.2.	
Mục đích: Đối với các chất pha loãng, số lượng vi sinh vật sau thời gian tiếp xúc, phải nằm trong khoảng ± 30 % số lượng ban đầu.	
2. Tính chọn lọc: mục đích của tiêu chí hiệu năng này là để xác minh rằng các chủng gây nhiễu (không phải đích) bị ức chế một phần hoặc hoàn toàn bởi môi trường chọn lọc.	
^f Tính chọn lọc định tính (môi trường lỏng): xem 8.3.	
Mục đích: các vi sinh vật thử nghiệm (không mong muốn) bị ức chế hoàn toàn.	
^g Tính chọn lọc định tính (môi trường thạch): xem 7.4.	
Mục tiêu: Các vi sinh vật thử nghiệm (không mong muốn) bị ức chế một phần hoặc hoàn toàn.	
^h Tính chọn lọc định tính (môi trường lỏng): xem 8.3.	
Mục tiêu: Không phát triển (hoặc <10 cfu) các vi sinh vật (không mong muốn) trên môi trường thạch không chọn lọc được sử dụng để phát hiện.	
3. Tính đặc hiệu: Mục đích của tiêu chí hiệu năng này là để xác minh rằng các chủng gây nhiễu (không phải đích) không bị ức chế không tạo ra các khuẩn lạc đặc trưng.	
ⁱ Tính đặc hiệu định tính (môi trường thạch): xem 7.4.	
Mục đích: các khuẩn lạc của các chủng không phải đích thử nghiệm không được có vẻ bên ngoài của các vi sinh vật đích trong các phương pháp đã chuẩn hóa.	
Các tiêu chí này phải được kiểm tra xác nhận với thời gian và nhiệt độ đã chuẩn hóa.	

J.4 Chọn các chủng kiểm chứng hiệu năng

J.4.1 Yêu cầu chung

Mục đích của các tiêu chí hiệu năng khác nhau và phạm vi của phương pháp tiêu chuẩn hóa phải xác định việc chọn các chủng kiểm chứng, nghĩa là:

- Các chủng đích (hiệu suất) được phát hiện hoặc được định lượng trong phương pháp, và
- Các chủng không phải đích (tính chọn lọc, tính đặc hiệu) thuộc hệ thực vật gây nhiễu thường gặp trong các nền mẫu được phân tích.

Các chủng kiểm chứng được mô tả trong Phụ lục E và Phụ lục F, đã được thử nghiệm trên môi trường xác định, phải được sử dụng, nếu có thể.

Nếu chứng minh được (tính không ổn định di truyền, không đủ khả năng tái sinh của các chủng QC đã xác định trước đó v.v...), thì chủ trì dự án có thể đề xuất thay đổi các chủng yêu cầu, theo các hướng dẫn trong điều này.

J.4.2 Đánh giá sự phù hợp của các chủng kiểm chứng mới

Trước khi giới thiệu một chủng mới, thì sự phù hợp để sử dụng trong phép thử hiệu năng phải được đánh giá xác nhận và lập thành văn bản. Điều này đòi hỏi việc chứng minh khả năng lặp lại của phép kiểm soát hiệu năng ít nhất hai (tốt nhất là ba) phòng thử nghiệm độc lập, sử dụng hai hoặc ba lô hàng khác nhau của các công thức đã tiêu chuẩn hóa hoặc từ các nhà sản xuất thương mại khác nhau trong từng phòng thử nghiệm.

J.4.3 Môi trường mới

Đối với môi trường mới bất kỳ, các chủng kiểm chứng phải:

- được chọn ưu tiên từ các chủng được mô tả trong Phụ lục E hoặc Phụ lục F;
- được đánh giá trước đó và được chứng minh là phù hợp (xem J.4.2);
- hoặc mới được giới thiệu trong các điều kiện sau đây:
 - tốt nhất là chúng có nguồn gốc từ thực phẩm hoặc từ các mẫu nước;
 - chúng phải sẵn có trong ít nhất hai bộ sưu tập chủng quốc tế, với mức giá chấp nhận được;
 - đã được đánh giá trước đó và được chứng minh là phù hợp (xem J.4.2).

J.4.4 Số lượng các chủng cho mỗi tiêu chí

Chú thích a của Bảng: hiệu suất định tính (môi trường lỏng): xem 8.4.

Hai chủng đích: chủng typ A và chủng typ B

Typ A: chủng được thử nghiệm trong kiểm soát chất lượng hiệu năng của nhà sản xuất môi trường và người sử dụng cuối cùng.

Typ B: chủng chỉ yêu cầu nhà sản xuất môi trường thử nghiệm.

Chú thích b của Bảng: hiệu suất định lượng (môi trường thạch): xem 7.2.1.1.

Hai chủng đích: chủng A và chủng B

Chú thích c của Bảng: hiệu suất định lượng (môi trường lỏng): xem 8.3.

Hai chủng đích: chủng A và chủng B mỗi chủng liên quan đến hai chủng không phải đích.

Chú thích d của Bảng: hiệu suất định tính (môi trường thạch): xem 7.4.

Hai chủng đích: chủng A và chủng B.

Chú thích e của Bảng: hiệu suất định lượng (môi trường lỏng): xem 8.2

Hai chủng đích: chủng A và chủng B.

Chú thích f của Bảng: tính chọn lọc định tính (môi trường lỏng): xem 8.3

Hai chủng không phải đích: chủng A và chủng B

Chú thích g của Bảng: tính chọn lọc định tính (môi trường thạch): xem 7.4

Hai chủng không phải đích: chủng A và chủng B

Chú thích h của Bảng: tính chọn lọc định tính (môi trường lỏng): 8.3

Hai chủng không phải đích: chủng A và chủng B

Chú thích i của Bảng: tính chọn lọc định tính (môi trường thạch): 7.4

Một chủng không phải đích: chủng A

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN ISO 9000, *Hệ thống quản lý chất lượng – Cơ sở và từ vựng*
- [2] TCVN ISO 9001, *Hệ thống quản lý chất lượng – Các yêu cầu*
- [3] TCVN 8890:2011 (ISO Guide 30:1992 with Amendment 1:2008), *Thuật ngữ và định nghĩa sử dụng cho mẫu chuẩn*
- [4] ISO 6222, *Water quality – Enumeration of culturable micro-organisms – Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium*
- [5] TCVN 4851 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*
- [6] TCVN 7790-1 (ISO 2859-1), *Quy trình lấy mẫu để kiểm tra định tính – Phần 1: Chương trình lấy mẫu được xác định theo giới hạn chất lượng chấp nhận (AQL) để kiểm tra từng lô*
- [7] TCVN 9331 (ISO/TS 22117), *Vi sinh vật thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn và các yêu cầu cụ thể về thử nghiệm thành thạo thông qua so sánh liên phòng thử nghiệm*
- [8] Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) Procedure no 10, 2002, *Control of microbiological media*
- [9] AUSTRALIAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY Guidelines for assuring quality of food and water microbiological culture media. Second Edition, 2014
- [10] EUROPEAN PHARMACOPOEIA 2010 7th ed, Council of Europe, France. Chapters 2.6.12 and 2.6.13
- [11] UNITED STATES PHARMACOPOEIA 2011, 35th ed, The United States Pharmacopoeial Convention, USA. Chapter 1117. *Microbiological Best Laboratory Practice*
- [12] DIN 58942-4:2003, *Medical Microbiology – Culture media – Transport systems for specimen containing bacteria*
- [13] DIN 58942-4, Suppl. 1:2003, *Medical Microbiology – Culture media – Systems, media and conditions for the transport of selected pathogens in clinical specimens*
- [14] DIN 58959-6, Suppl. 1:1997, *Quality management in medical microbiology – Requirements for control strains – Examples for production and preservation of bacteria used as stock cultures and working cultures*
- [15] DIN 58959-6, Suppl. 2:1997, *Quality management in medical microbiology – Requirements for control strains – Examples for production and preservation of fungi used as stock cultures and working cultures*
- [16] DIN 58959-9, Suppl. 1:1997, *Quality management in medical microbiology – Requirements for the use of control strains for testing culture media – Control strains for commonly used culture media*

- [17] DIN 58959-9, *Suppl. 2:1997, Quality management in medical microbiology – Requirements for the use of control strains for testing culture media – Maximum storage times for ready-to-use culture media*
- [18] DIN 58959-10:1997, *Quality management in medical microbiology – Requirements for the use of control strains for testing reagents, dyes and biological materials*
- [19] DIN 58959-10, *Suppl. 1:1997, Quality management in medical microbiology – Requirements for the use of control strains for testing reagents, dyes and biological materials – Control strains for commonly used materials*
- [20] WORLD DATA CENTRE FOR MICROORGANISMS *Reference Strain Catalogue pertaining to organisms for performance testing of culture media.* Available (viewed 2013-10-14) at <http://www.wfcc.info>
- [21] J.E.L. Corry, G.D.W. Curtis, R.M. Baird eds. *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology.* Royal Society of Chemistry, UK, Third Edition, 2012
- [22] G.D.W. Curtis, R.M. Baird, N.P. Skovgaard, J.E.L. Corry *Int. J. Food Microbiol.* 1998, 45 p. 65 [A statement from the IUMS-ICFMH working party on culture media II]
- [23] C. Bell, P. Neaves, A.P. Williams *Food Microbiology and Laboratory Practice.* Blackwell Science, Oxford, 2005
- [24] J.H. Hagemann Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 1984, 160 pp. 438–441
- [25] V.K. Sharma, P.N. Hobson A sporulation medium for strict anaerobes. *Lett. Appl. Microbiol.* 1985, 1 pp. 31–32
- [26] B. Jarvis *Statistical aspects of the microbiological examination of foods.* Academic Press, London, Second Edition, 2008
- [27] A.M. Cundell, S. Chatellier, P. Schumann, R. Lilischkis *Equivalence of quality control strains of microorganisms used in the compendial microbiological tests: are national culture collection strains identical?* *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 2010, 64 pp. 137–155
- [28] L.J. Cross, J.E. Russell, M. Desai Examining the genetic variation of reference microbial cultures used within food and environmental laboratories using fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 2011, 321 (2) pp. 100–106
- [29] J.F. Schijven, A.H. Havelaar, M. Bahar A simple and widely applicable method for preparing homogeneous and stable quality control samples in water microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 60 (11) pp. 4160–4162
- [30] R. Araujo, A.G. Rodrigues, C. Pina-Vaz A fast practicable and reproducible procedure for standardization of the cell density of an *Aspergillus* inoculum. *J. Med. Microbiol.* 2004, 53 pp. 783–786
- [31] M. Wesche Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *J. Food Prot.* 2009, 72 (5) pp. 1121–1138

- [32] DB Kell 1998, *Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues*. *A v Leeuwenhoek* 73 pp. 169–187
- [33] N.J. Rowan Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis? *Trend Food Sciences.* 2004, 15 pp. 462–467
- [34] TCVN 6910-6 (ISO 5725-6), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 6: Sử dụng các giá trị độ chính xác trong thực tế*
- [35] G.M. Garrity ed. et al. *Bergery's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Springer, New York, NY, USA, 2001-2012
- [36] AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION Bacterial Culture Guide. Manassas, VA, USA, 2012
- [37] AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION Preservation and recovery of filamentous fungi. Tech.Bull. No 2 Manassas, VA, USA, 2011
- [38] AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION Reference strains – How many passages are too many? Tech. Bull, No 6 Manassas, VA, USA, 2011
- [39] NEN 6603, *Environmental and Food – Internal quality control by the use of control charts with chemical and microbiological analysis*
- [40] TCVN 4882 (ISO 4831), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng coliform – Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất*
- [41] TCVN 6848 (ISO 4832), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng coliform – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc*
- [42] TCVN 4884 (ISO 4833), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng vi sinh vật trên đĩa thạch – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 độ C*
- [43] TCVN 6191-1 (ISO 6461-1), *Chất lượng nước – Phát hiện và đếm số bào tử vi khuẩn kị khí khử sunfit (clostridia) – Phần 1: Phương pháp tăng sinh trong môi trường cấy lỏng*
- [44] TCVN 6191-2 (ISO 6461-2), *Chất lượng nước – Phát hiện và đếm số bào tử vi khuẩn kị khí khử sunfit (clostridia) – Phần 2: Phương pháp màng lọc*
- [45] TCVN 4829 (ISO 6579), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện Salmonella trên đĩa thạch*
- [46] Sửa đổi 1:2008 TCVN 4829:2005 (ISO 6579:2002, Amd. 1:2007), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện Salmonella spp. trên đĩa thạch – Sửa đổi 1: Phụ lục D: Phát hiện Salmonella spp. trong phân động vật và trong mẫu môi trường từ giai đoạn sản xuất ban đầu*
- [47] TCVN 4830-1 (ISO 6888-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Staphylococci có phản ứng dương tính coagulase (*Staphylococcus aureus* và các loài khác) trên đĩa thạch – Phần 1: Kỹ thuật sử dụng môi trường thạch Baird-Parker*

TCVN 8128:2015

- [48] TCVN 4830-2 (ISO 6888-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Staphylococci có phản ứng dương tính coagulase (*Staphylococcus aureus* và các loài khác) trên đĩa thạch – Phần 2: Kỹ thuật sử dụng môi trường thạch fibrinogen huyết tương thỏ*
- [49] TCVN 4830-3 (ISO 6888-3), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase (*Staphylococcus aureus* và các loài khác) trên đĩa thạch – Phần 3: Phát hiện và dùng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN) để đếm số lượng nhỏ*
- [50] TCVN 6846 (ISO 7251), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng *Escherichia coli* giả định – Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất*
- [51] TCVN 6189-1:2009 (ISO 7899-1:1998 with Cor 1:2000), *Chất lượng nước – Phát hiện và đếm khuẩn đường ruột – Phần 1: Phương pháp thu nhỏ (số có xác suất lớn nhất) đối với nước mặn và nước thải*
- [52] TCVN 6189-2:2009 (ISO 7899-2:2000), *Chất lượng nước – Phát hiện và đếm khuẩn đường ruột – Phần 2: Phương pháp lọc màng*
- [53] TCVN 4992 (ISO 7932), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng *Bacillus cereus* giả định trên đĩa thạch – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 độ C*
- [54] TCVN 4991 (ISO 7937), *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*
- [55] TCVN 6187-1 (ISO 9308-1), *Chất lượng nước – Phát hiện và đếm *Escherichia coli* và vi khuẩn coliform – Phần 1: Phương pháp lọc màng*
- [56] TCVN 6187-2 (ISO 9308-2), *Chất lượng nước – Phát hiện và đếm *Escherichia coli* và vi khuẩn coliform – Phần 2: Phương pháp nhiều ống (số có xác suất cao nhất)*
- [57] ISO 9308-3:1998, *Water quality – Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) for the detection and enumeration of *E. coli* in surface and waste water*
- [58] TCVN 7715-1 (ISO 10272-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng *Campylobacter* spp. – Phần 1: Phương pháp phát hiện*
- [59] TCVN 7715-2 (ISO/TS 10272-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng *Campylobacter* spp. – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc*
- [60] TCVN 7715-3 (ISO/TS 10272-3), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng *Campylobacter* spp. – Phần 3: Phương pháp bán định lượng*
- [61] TCVN 8127 (ISO 10273), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phát hiện *Yersinia enterocolitica* gây bệnh giả định*
- [62] TCVN 8899 (ISO/TS 11059), *Sữa và sản phẩm sữa – Phương pháp định lượng *Pseudomonas* spp.*

- [63] TCVN 7700-1 (ISO 11290-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng Listeria monocytogenes – Phần 1: Phương pháp phát hiện*
- [64] TCVN 7700-2 (ISO 11290-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng Listeria monocytogenes – Phần 2: Phương pháp định lượng*
- [65] ISO 11731, *Water quality – Enumeration of Legionella*
- [66] ISO 11731-2, *Water quality – Detection and enumeration of Legionella – Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts*
- [67] TCVN 7138 (ISO 13720), *Thịt và sản phẩm thịt – Định lượng Pseudomonas spp. giả định*
- [68] ISO 14189, *Water quality – Enumeration of Clostridium perfringens – Method using membrane filtration*
- [69] TCVN 7902 (ISO 15213), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng vi khuẩn khử sulfit phát triển trong điều kiện kị khí*
- [70] TCVN 7906 (ISO 15214), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt trung bình – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 °C*
- [71] TCVN 8881 (ISO 16266), *Chất lượng nước – Phát hiện và đếm Pseudomonas aeruginosa – Phương pháp màng lọc*
- [72] TCVN 7924-1 (ISO 16649-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Escherichia coli dương tính b-glucuronidaza – Phần 1: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng màng lọc và 5-bromo-4-clo-3-indolyl b-D-glucuronid*
- [73] TCVN 7924-2 (ISO 16649-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Escherichia coli dương tính b-glucuronidaza – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng 5-bromo-4-clo-3-indolyl b-D-glucuronid*
- [74] TCVN 7924-3 (ISO/TS 16649-3), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Escherichia coli dương tính b-glucuronidaza – Phần 3: Kỹ thuật tính số có xác suất lớn nhất sử dụng 5-bromo-4-clo-3-indolyl b-D-glucuronid*
- [75] TCVN 7686 (ISO 16654), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện Escherichia coli O157*
- [76] ISO 17995, *Water quality – Detection and enumeration of thermotolerant Campylobacter species*
- [77] TCVN 9717 (ISO 19250), *Chất lượng nước – Phát hiện Salmonella spp.*
- [78] TCVN 8275-1 (ISO 21527-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc – Phần 1: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước lớn hơn 0,95*
- [79] TCVN 8275-2 (ISO 21527-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0,95*

- [80] TCVN 5518-1 (ISO 21528-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng Enterobacteriaceae – Phần 1: Phát hiện và định lượng bằng kỹ thuật MPN có tiền tăng sinh*
 - [81] TCVN 5518-2 (ISO 21528-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng Enterobacteriaceae – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc*
 - [82] TCVN 7903 (ISO 21871), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp xác định số lượng nhù Bacillus cereus giả định – Phương pháp phát hiện và kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất*
 - [83] TCVN 7905-1 (ISO/TS 21872-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện Vibrio spp. có khả năng gây bệnh đường ruột – Phần 1: Phát hiện Vibrio parahaemolyticus và Vibrio cholerae*
 - [84] TCVN 7905-2 (ISO/TS 21872-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện Vibrio spp. có khả năng gây bệnh đường ruột – Phần 2: Phát hiện các loài không phải là Vibrio parahaemolyticus và Vibrio cholerae*
 - [85] European Culture Collections' Organisation (ECCO), available at <http://www.ecosite.org>
 - [86] European Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Available (viewed 2013-10-14) at <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:EN:PDF>
 - [87] World Federation for Culture Collections (WFCC). Available at <http://www.wfcc.info>
-