

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 6404:2016
ISO 7218:2007 WITH AMENDMENT 1:2013**

Xuất bản lần 4

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

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

HÀ NỘI - 2016

Lời nói đầu

TCVN 6404:2016 thay thế TCVN 6404:2008;

TCVN 6404:2016 hoàn toàn tương đương với ISO 7218:2007,

Sửa đổi 1 năm 2013;

TCVN 6404:2016 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.

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

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

1 Phạm vi áp dụng

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

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

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

Các hướng dẫn bổ sung trong lĩnh vực kiểm tra sinh học phân tử được quy định trong TCVN 11134 (ISO 22174).

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

TCVN 6404:2016

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

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

2 Tài liệu viện dẫn

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

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

TCVN 7150 (ISO 835), *Dụng cụ thử nghiệm bằng thủy tinh – Pipet chia độ*

TCVN 8128 (ISO 11133), *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*.

TCVN 9332 (ISO/TS 19036:2006, With Amd. 1:2009) *Vi sinh vật thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn ước lượng độ không đảm bảo đo đối với các phép phân tích định lượng*.

TCVN 9716:2013 (ISO 8199:2005) *Chất lượng nước – Hướng dẫn chung về đếm vi sinh vật bằng nuôi cấy*.

TCVN 10505 (ISO 8655) (tất cả các phần), *Dụng cụ đo thể tích có cơ cấu pittông*.

TCVN 11134 (ISO 22174) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Định nghĩa và yêu cầu chung*.

ISO 16140-2, *Microbiology of food and animal feed – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp đánh giá xác nhận – Phần 2: Thủ tục đánh giá xác nhận các phương pháp thay thế dựa theo phương pháp chuẩn)*.

3 Cơ sở thử nghiệm

3.1 Yêu cầu chung

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

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

3.2 Các vấn đề về an toàn

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.3 Thiết kế phòng thử nghiệm

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

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

3.4 Khu vực thử nghiệm

3.4.1 Yêu cầu chung

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

3.4.2 Khu vực lấy mẫu và thử nghiệm

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

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

3.4.3 Khu vực chung

Các khu vực thuộc loại này bao gồm:

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

3.5 Bố trí và lắp đặt nhà xưởng

3.5.1 Mục tiêu

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

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

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

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

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

3.5.2 Lắp đặt

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

- a) tường, trần và sàn nhà phải nhẵn, dễ rửa và chịu được các chất tẩy rửa và các chất khử trùng dùng trong phòng thử nghiệm.
- b) sàn nhà không được trơn.
- c) không để các đường ống dẫn chất lỏng trên mặt đất đi ngang qua cơ sở thử nghiệm trừ khi chúng được bọc kín. Mọi cấu trúc nồi phía trên cần được bọc kín hoặc dễ làm vệ sinh định kỳ.
- d) các cửa ra vào và cửa sổ cần được đóng kín khi đang tiến hành thử để ngăn gió lùa. Ngoài ra, chúng phải được thiết kế sao cho chống được bụi bám và dễ lau rửa. Nhiệt độ môi trường xung quanh (18 °C đến 27 °C) và chất lượng không khí (mật độ vi sinh vật, tốc độ phát tán bụi v.v..) cần tương thích với việc thực hiện các phép thử. Để thực hiện điều này nên dùng hệ thống lọc không khí đi vào và đi ra.
- e) lắp hệ thống bảo vệ tránh bụi từ khu vực xử lý môi trường nuôi cấy khô, mẫu dạng bụi hoặc dạng bột.

f) Khi phép thử được tiến hành trong môi trường ít bị nhiễm bẩn, thì phòng thử nghiệm phải được trang bị đặc biệt, với một tủ cây thổi không khí sạch và /hoặc một tủ an toàn.

g) Môi trường phòng thử nghiệm cần được bảo vệ chống bức xạ mặt trời ở phía ngoài bằng cách sử dụng các cửa chớp hoặc các tấm thuỷ tinh đã xử lý thích hợp. Không nên sử dụng các rèm che phía trong vì khó làm vệ sinh và trở thành nguồn tích bụi.

3.5.3 Các điểm khác

Các điểm khác cần được xem xét là:

- nguồn nước, chất lượng nước thích hợp cho mục đích sử dụng;
- nguồn điện.
- khí đốt (đường ống hoặc bình).
- ánh sáng đầy đủ trong mọi bộ phận của phòng thử nghiệm;
- mặt bàn và các trang bị của phòng thử nghiệm phải được chế tạo bằng vật liệu nhẵn trơn, không thấm, dễ làm sạch và khử trùng;
- các trang thiết bị của phòng thử nghiệm phải được thiết kế sao để thuận tiện cho việc lau rửa sàn nhà (ví dụ, các trang thiết bị thử nghiệm có thể di chuyển được).
- các trang thiết bị, các tài liệu không sử dụng thường xuyên không để trong khu vực thử nghiệm;
- tinh sẵn có của các phương tiện bảo quản tài liệu để sử dụng khi thao tác với mẫu, môi trường nuôi cây, hoá chất .v.v..
- cung cấp bồn rửa tay trong mỗi phòng thử nghiệm và các khu vực chung nếu cần, nên để gần cửa;
- tinh sẵn có của dụng cụ hấp áp lực để khử nhiễm môi trường nuôi cây và vật liệu thải, trừ khi có sẵn có hệ thống loại bỏ vật liệu thải thích hợp bằng cách đốt;
- các hệ thống an toàn phòng cháy, điện, thiết bị rửa mắt và vòi tắm hoa sen;
- thiết bị phụ trợ.

3.6 Làm sạch và khử trùng

Các điểm dưới đây cần phải được kiểm tra:

- a) Mặt sàn, tường, trần, mặt bàn và các trang thiết bị của phòng thử nghiệm phải được bảo dưỡng thường xuyên và sửa chữa để tránh nứt rạn dẫn đến bụi bẩn có thể tích tụ và gây ra nhiễm bẩn.

b) Thường xuyên lau rửa và khử trùng để giữ cho các phòng luôn trong trạng thái thích hợp để tiến hành thử nghiệm. Các bề mặt bị nhiễm bẩn hoặc có khả năng nhiễm bẩn cần được khử nhiễm bằng chất tẩy rửa đã biết có tính diệt nấm và diệt khuẩn.

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

c) Hệ thống thông gió và các bộ lọc của chúng cần được bảo dưỡng thường xuyên và thay các bộ lọc khi cần.

d) Cần kiểm tra số lượng vi sinh vật định kỳ trên các bề mặt làm việc của phòng thử nghiệm, nhân viên tiếp xúc với các bề mặt và không khí cần được kiểm tra định kỳ (tần số phụ thuộc vào các kết quả thử nghiệm trước đó).

e) Độ nhiễm bẩn bề mặt có thể được đánh giá bằng cách áp trực tiếp miếng lây mẫu đã tẩm chất trung hoà thích hợp lên bề mặt (ví dụ: lexithin, natri thiosulfat). Chất lượng không khí có thể được kiểm tra bằng cách đặt một đĩa petri mở nắp có chứa môi trường thạch không chọn lọc (ví dụ: thạch đếm đĩa-PAC) hoặc thạch chọn lọc thích hợp cho sinh vật đích (ví dụ: nấm mốc) trong 15 min.

CHÚ THÍCH 2: Có thể dùng các phương pháp khác để xác định độ nhiễm bẩn bề mặt và không khí. Xem TCVN 8129 (ISO 18593).

4 Nhân sự

4.1 Yêu cầu chung

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

4.2 Năng lực

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

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

CHÚ THÍCH: Một trong những nguyên nhân gây sai lệch kết quả đếm khuẩn lạc (hút bằng pipet, độ không đồng nhất của huyền phù ban đầu, đếm .v.v...) khi định lượng khuẩn lạc bằng phương pháp đếm trong TCVN 9330-1 (ISO 14461-1).

4.3 Kiểm tra năng lực thực hiện của nhân viên

Việc kiểm tra năng lực thực hiện của nhân viên cần được đánh giá định kỳ theo các thông số mục tiêu. Điều này bao gồm việc tham gia vào các chương trình đảm bảo chất lượng nội bộ, các thử nghiệm thành thạo [xem TCVN 7777-1 (ISO/IEC Guide 43-1)], sử dụng vật liệu chuẩn, hoặc các phép thử tự đánh giá về định lượng vi sinh vật như mô tả trong TCVN 9330-2 (ISO 14461-2).

4.4 Vệ sinh

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

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

5 Thiết bị, dụng cụ

5.1 Yêu cầu chung

Theo thực hành tốt phòng thử nghiệm, tất cả các thiết bị, dụng cụ cần được giữ sạch và trong tình trạng hoạt động tốt. Trước khi sử dụng, thiết bị và dụng cụ cần được kiểm tra sao cho phù hợp với mục đích đã định và hiệu năng của thiết bị được theo dõi trong suốt quá trình sử dụng, khi thích hợp.

Khi cần, thiết bị và các bộ phận kiểm soát thiết bị phải được hiệu chuẩn theo các tiêu chuẩn quốc gia, và việc hiệu chuẩn lại, các lần kiểm tra trung gian, các quy trình đã thực hiện và kết quả phải được ghi lại thành văn bản.

Thiết bị phải được kiểm tra và được bảo dưỡng thường xuyên để đảm bảo an toàn và phù hợp với mục đích sử dụng. Thiết bị cần được kiểm tra theo các điều kiện làm việc và độ chính xác yêu cầu của kết quả.

Tần suất hiệu chuẩn và kiểm tra xác nhận của từng hạng mục thiết bị trong hầu hết các trường hợp, không quy định trong tiêu chuẩn này, mà do từng phòng thử nghiệm xác định, tùy thuộc vào loại thiết bị và mức độ hoạt động và theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trong một số ít trường hợp, tần suất này được quy định, nếu cần.

Thiết bị và dụng cụ phải được bố trí và lắp đặt để thuận tiện cho việc vận hành và dễ dàng bảo dưỡng, vệ sinh, khử trùng và hiệu chuẩn.

Mọi độ không đảm bảo đo được nêu trong điều này đều liên quan đến thiết bị, dụng cụ và không phải cho toàn bộ phương pháp phân tích.

Trong điều này, các yêu cầu về độ chính xác của thiết bị đo được đưa ra dựa trên dung sai thực tế cần thiết để chứng minh giới hạn phù hợp của thiết bị được sử dụng thường xuyên. Độ chính xác quy định có liên quan đến độ không đảm bảo về đo lường của thiết bị (xem ISO/IEC Guide 99).

Đối với thiết bị kiểm soát nhiệt độ, kiểm tra độ ổn định và độ đồng đều của nhiệt độ trước khi sử dụng lần đầu và sau bất kỳ lần sửa chữa hoặc thay đổi nào mà có thể ảnh hưởng đến việc kiểm soát nhiệt độ.

5.2 Tủ an toàn

5.2.1 Mô tả

Tủ an toàn là buồng làm việc có dòng không khí thổi theo chiều ngang hoặc theo chiều dọc để loại bỏ bụi và các chất dạng hạt khác, ví dụ như loại bỏ vi khuẩn ra khỏi không khí.

Số lượng tối đa các chất dạng hạt cho phép trên một mét khối với kích thước lớn hơn hoặc bằng $0,5 \mu\text{m}$ có trong lớp bụi-lan rộng của tủ an toàn. Đối với các tủ sử dụng trong các phòng thử nghiệm vi sinh thực phẩm, thì số lượng các chất dạng hạt không được vượt quá 4 000 trên mỗi mét khối.

Có bốn loại tủ an toàn được sử dụng trong các phòng thử nghiệm vi sinh thực phẩm:

- Tủ an toàn sinh học cấp 1 là các tủ bảo vệ thoát khí, mở phía trước để bảo vệ người sử dụng và môi trường nhưng không bảo vệ được sản phẩm khỏi sự nhiễm bẩn. Khả năng nhiễm sol khí chứa trong khoang và được giữ lại trên bộ lọc. Không khí đã lọc thường được thả vào môi trường, nếu không thì không khí phải đi qua hai bộ lọc không khí có hiệu quả cao (HEPA) để lọc các chất hạt dinh liền nhau. Các bộ lọc này nên dùng cho các vi sinh vật gây bệnh nguy cơ cấp 3 vì rất khó để duy trì và đảm bảo an toàn cho người vận hành một cách thích hợp.
- Tủ an toàn sinh học cấp 2 là các tủ bảo vệ sản phẩm, người vận hành và môi trường. Tủ này tái tuần hoàn một lượng không khí đã lọc, thả một phần vào khí quyển và lấy không khí thay thế thông qua lỗ làm việc, do đó bảo vệ được người vận hành. Các loại tủ này rất thích hợp để làm việc với các vi sinh vật gây bệnh có nguy cơ cấp 2 và cấp 3.

c) Tủ có luồng không khí thổi theo chiều ngang bảo vệ các thao tác khỏi sự nhiễm bẩn, nhưng lại thổi sol khí sinh ra trực tiếp vào mặt của người vận hành. Do đó, chúng không thích hợp để xử lý các chủng nuôi cấy hoặc chuẩn bị nuôi cấy mô tế bào.

d) Tủ có luồng không khí thổi theo chiều dọc bảo vệ sản phẩm bằng cách sử dụng dòng không khí thổi dọc đã được lọc qua bộ lọc không khí HEPA. Các tủ này cũng bảo vệ được người vận hành bằng cách sử dụng không khí tuần hoàn bên trong. Các tủ này đặc biệt thích hợp để chuẩn bị môi trường vô trùng để xử lý các sản phẩm vô trùng và bảo vệ người vận hành khi xử lý các sản phẩm dạng bột.

Sử dụng các tủ an toàn cho tất cả các thao tác liên quan đến việc xử lý các vi sinh vật gây bệnh và các sản phẩm dạng bột bị nhiễm bẩn, nếu có quy định.

Không nên sử dụng đầu đốt khí hoặc đèn cồn trong tủ an toàn. Nếu cần, ngọn lửa ở đầu đốt phải nhỏ tới mức không làm cho luồng không khí bị xáo trộn. Việc sử dụng các thiết bị dùng một lần (que cấy vòng, pipet, v.v...) là sự lựa chọn thích hợp.

5.2.2 Sử dụng

Sử dụng các tủ bảo vệ phù hợp với ứng dụng dự kiến và các điều kiện môi trường trong phòng thử nghiệm.

Cần để các tủ này càng xa các thiết bị càng tốt.

Khi thích hợp, cho tất cả mọi thứ cần thiết vào trong tủ trước khi bắt đầu làm việc để giảm thiểu số lần thao tác vào và ra tại khoang làm việc. Bố trí thiết bị và vật liệu để giảm thiểu xáo trộn luồng không khí tại khoang làm việc.

Người vận hành cần được đào tạo đầy đủ về việc sử dụng tủ đúng cách để đảm bảo an toàn và tính toàn vẹn của sản phẩm hoặc chủng cấy.

5.2.3 Làm sạch và khử trùng

Làm sạch và khử trùng khu vực làm việc sau khi sử dụng bằng chất khử trùng thích hợp và không ăn mòn theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thường xuyên kiểm tra lưới dây bảo vệ các bộ lọc trước, nếu có và lau sạch bằng vải đã ngâm trong chất khử trùng.

Đối với các tủ có luồng không khí thổi thì bề mặt của bộ lọc cần được làm sạch định kỳ bằng chà không, cẩn thận không làm hư hỏng môi trường của bộ lọc.

Tủ an toàn cần được khử trùng bằng khí trước khi thay hoặc sửa chữa bộ lọc.

Sau khi làm sạch các tủ, có thể sử dụng đèn cực tím (UV) để khử trùng. Đèn UV cần được làm sạch định kỳ và thay thế phù hợp với hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu sử dụng, thi cần thường xuyên làm

sạch để loại bỏ bụi bẩn nhằm ngăn chặn hiệu quả sự diệt khuẩn của tia cực tím. Cường độ tia cực tím cần được kiểm tra khi tủ được đánh giá lại để đảm bảo rằng việc phát xạ ánh sáng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Xem Thư mục tài liệu tham khảo [17].

5.2.4 Bảo dưỡng và kiểm tra

Hiệu quả của các tủ an toàn phải được người có trình độ hoặc người đã được cấp chứng nhận kiểm tra khi mới mua tủ về và định kỳ kiểm tra theo khuyến cáo của nhà sản xuất, cũng như bất kỳ việc sửa chữa hoặc sửa đổi nào. Hiệu quả của tủ cần được kiểm tra sau khi di dời.

Tiến hành định kỳ đánh giá xác nhận về sự nhiễm khuẩn bằng cách kiểm tra các bề mặt làm việc và thành trong của tủ.

Định kỳ đánh giá xác nhận số lượng các vi sinh vật trong không khí có mặt trong suốt quá trình vận hành của các bộ lọc bằng cách sử dụng các thiết bị thông thường. Ví dụ, đặt một vài đĩa Petri có chứa môi trường nuôi cấy thạch không chọn lọc (ví dụ: thạch đếm đĩa) 30 min trong mỗi tủ. Có thể sử dụng các phương pháp khác.

5.3 Cân và các bộ pha loãng theo trọng lượng

5.3.1 Sử dụng và độ không đảm bảo đo

Cân chủ yếu được sử dụng để cân phần mẫu thử cần kiểm tra và cân các thành phần của môi trường nuôi cấy và thuốc thử. Ngoài ra, cân có thể được sử dụng để đo các thể tích dịch pha loãng theo khối lượng.

Các bộ pha loãng theo trọng lượng là các dụng cụ điện tử gồm có cân và các bộ phận phối chất lỏng có lên chương trình và được sử dụng trong quá trình chuẩn bị các huyền phù mẫu ban đầu; chúng được sử dụng để bổ sung chất pha loãng vào mẫu con theo một tỷ lệ nhất định. Mẫu con sau đó được cân đến độ chính xác quy định và bộ pha loãng được cài đặt để phân phối đủ lượng chất pha loãng đối với tỷ lệ yêu cầu quy định (ví dụ: từ 9 đến 1 đối với các dung dịch pha loãng thập phân). Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

Phòng thử nghiệm vi sinh thực phẩm phải được trang bị các loại cân trong phạm vi yêu cầu và có độ không đảm bảo đo đối với các sản phẩm khác nhau cần được cân.

Độ chính xác của cân cần đạt dung sai 1 % nhưng phải đủ để đạt được dung sai tối đa 5 % khối lượng, trừ khi có quy định khác.

VÍ DỤ: Để cân 10 g, thì cân cần có khả năng đọc đến 0,1 g.

Để cân 1 g, thì cân cần có khả năng đọc đến 0,01 g.

Đặt thiết bị trên một mặt phẳng nằm ngang ổn định, điều chỉnh nếu cần để đảm bảo mức thăng bằng, chống rung và xê dịch.

5.3.2 Làm sạch và khử trùng

Thiết bị cần được làm sạch và khử trùng sau khi sử dụng hoặc sau khi có rơi vãi trong quá trình cân, sử dụng chất tẩy trùng thích hợp và không ăn mòn.

5.3.3 Kiểm tra xác nhận hiệu năng và hiệu chuẩn

5.3.3.1 Hiệu chuẩn

Việc hiệu chuẩn phải do người đã được đào tạo kiểm tra trên toàn bộ phạm vi, với tần suất phụ thuộc vào mức độ sử dụng.

5.3.3.2 Kiểm tra xác nhận

Hiệu năng của hệ thống cân do người đã được đào tạo định kỳ kiểm tra xác nhận trong quá trình sử dụng và sau khi làm sạch bằng cách kiểm tra khối lượng trong dài sử dụng.

CHÚ THÍCH: Kiểm tra khối lượng cũng có thể được xác nhận ngay sau khi hiệu chuẩn cân.

5.4 Bộ đồng hóa, máy nghiền trộn và máy trộn

5.4.1 Mô tả

Các thiết bị này được sử dụng để chuẩn bị huyền phù ban đầu từ mẫu thử nghiệm.

Các thiết bị sau đây có thể được sử dụng:

- Bộ trộn nhu động có các túi vô trùng, có thể có bộ phận điều chỉnh tốc độ và thời gian hoặc

CHÚ THÍCH: Stomacher[®] là một ví dụ về một sản phẩm phù hợp có sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không bắt buộc phải sử dụng sản phẩm này.

- Bộ đồng hóa quay (máy nghiền trộn), tốc độ danh nghĩa là từ 8 000 r/min đến 45 000 r/min, bao gồm, với các bát vô trùng có nắp đậy; hoặc

- Máy trộn rung có các túi vô trùng; hoặc

CHÚ THÍCH: Pulsifier[®] là một ví dụ về một sản phẩm phù hợp có sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không bắt buộc phải sử dụng sản phẩm này.

- Một hệ thống đồng hóa khác có hiệu quả tương đương.

Trong một số trường hợp, có thể tiến hành trộn thủ công sử dụng các viên bi thủy tinh vô trùng có đường kính thích hợp [khoảng 6 mm; xem TCVN 6507-2 (ISO 6887-2) đến TCVN 6507-5 (ISO 6887-5)].

5.4.2 Sử dụng

Thời gian hoạt động bình thường của một bộ đồng hóa kiểu nhu động là 1 min đến 3 min [xem TCVN 6507-2 (ISO 6887-2) đến TCVN 6507-5 (ISO 6887-5) đối với các loại thực phẩm cụ thể].

Không sử dụng các loại thiết bị kiểu này đối với một số loại thực phẩm nhất định, ví dụ như:

- các sản phẩm có nguy cơ làm thủng túi (có mặt các hạt sắc nhọn, cứng hoặc khô);
- các sản phẩm khó đồng hóa do cấu trúc của chúng (ví dụ: xúc xích dạng salami).

Bộ đồng hóa quay phải hoạt động trong khoảng thời gian với tổng số lượng vòng quay từ 15 000 r/min đến 20 000 r/min. Thậm chí, với bộ đồng hóa chậm nhất thì thời gian này cũng không được vượt quá 2,5 min.

Các máy trộn rung có thể được sử dụng cho hầu hết các loại thực phẩm, bao gồm các sản phẩm cứng hoặc các sản phẩm khô. Thông thường thời gian hoạt động là từ 0,5 min đến 1 min. Nếu các vi sinh vật có thể nằm sâu bên trong cấu trúc thì cần cắt mẫu thành từng miếng nhỏ trước khi xử lý.

Có thể sử dụng các viên bi thủy tinh khi chuẩn bị, bằng cách lắc các huyền phù ban đầu của một số sản phẩm nhót hoặc đặc, đặc biệt là các sản phẩm sữa (xem các tiêu chuẩn cụ thể).

5.4.3 Làm sạch và khử trùng

Thường xuyên làm sạch và khử trùng các bộ trộn kiểu nhu động và bộ trộn rung và sau bất kỳ túi nào bị tràn hoặc rò rỉ.

Đối với các bộ trộn quay, làm sạch và khử trùng các bề mặt bát thủy tinh hoặc bát kim loại sau mỗi lần sử dụng.

5.4.4 Bảo dưỡng

Kiểm tra và bảo dưỡng các thiết bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

5.5 Máy đo pH

5.5.1 Mô tả

Máy đo pH được sử dụng để đo chênh lệch điện thế, tại nhiệt độ xác định, giữa một điện cực đo và một điện cực so sánh, cả hai điện cực được đưa vào sản phẩm. Máy đo pH phải có khả năng đọc được đến 0,01 đơn vị pH, có thể thực hiện các phép đo chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị pH. Máy đo pH phải có chế độ bù nhiệt thủ công hoặc bù nhiệt tự động.

CHÚ THÍCH: Điện cực đo và điện cực so sánh thường được ghép cặp thành hệ thống điện cực kết hợp.

5.5.2 Sử dụng

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

Máy đo pH cũng có thể được sử dụng để đo giá trị pH của mẫu và các huyền phù mẫu thử. Việc sử dụng máy đo pH được đề cập trong các tiêu chuẩn cụ thể cho các sản phẩm cần phân tích, trong đó các điều kiện để xác định giá trị pH và điều chỉnh giá trị pH đều được quy định.

Việc chỉnh máy đo pH được nêu trong Sổ tay hướng dẫn của nhà sản xuất để đo giá trị pH ở nhiệt độ chuẩn, ví dụ 25 °C. Đọc giá trị pH sau khi đạt được sự ổn định. Ghi lại giá trị pH đến hai chữ số sau dấu phẩy.

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

5.5.3 Hiệu chuẩn và kiểm tra xác nhận

5.5.3.1 Hiệu chuẩn

Hiệu chuẩn máy đo pH theo hướng dẫn của nhà sản xuất, sử dụng ít nhất hai và tốt nhất là ba dung dịch đệm chuẩn ít nhất mỗi ngày trước khi sử dụng. Xác định dung sai cho phép tối đa đối với các số đọc này, phải nghiêm ngặt hơn so với dung sai cho phép sử dụng chung.

Các dung dịch chuẩn cần được theo dõi và phải có các giá trị pH quy định đến hai chữ số thập phân ở nhiệt độ đo (nhìn chung, từ pH 7,00 đến pH 4,00 và/hoặc pH 9,00 ở 25 °C, theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Các dung dịch chuẩn được sử dụng phải bao gồm các giá trị pH cần được đo.

5.5.3.2 Kiểm tra xác nhận

Sau khi hiệu chuẩn máy đo pH bằng hai dung dịch đệm chuẩn, cần sử dụng một dung dịch đệm chuẩn thứ ba để kiểm tra số đọc (trong phương thức "read") để chứng minh chức năng của máy đo pH.

Nếu các số đọc nằm ngoài các giới hạn tối đa cho phép, thì chỉnh máy đo pH theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Việc điều chỉnh này được thực hiện sau lần hiệu chuẩn và kiểm tra kế tiếp.

5.5.4 Bảo dưỡng

Kiểm tra và bảo dưỡng các điện cực theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Điều này là cần thiết, cụ thể phải theo dõi thường xuyên

- điều kiện của các điện cực liên quan đến sự già hóa và nhiễm bẩn; và

- thời gian đáp ứng và độ ổn định.

Rửa sạch các điện cực bằng nước cất hoặc khử ion sau mỗi lần sử dụng. Có tính đến sự nhiễm bẩn và sự già hóa của các điện cực, thường xuyên làm sạch kỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

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

5.6 Nồi hấp áp lực

5.6.1 Mô tả

Nồi hấp áp lực có nhiệt độ hơi bao hòa được giữ trong buồng.

Nồi hấp áp lực cần phải có:

- ít nhất một van an toàn;
- một van xả;
- thiết bị quy định cho phép nhiệt độ trong buồng được duy trì trong vòng $\pm 3^{\circ}\text{C}$ của nhiệt độ đích (để tính đến độ không đảm bảo do kết hợp với cặp nhiệt độ); và
- đầu dò nhiệt độ hoặc một cặp nhiệt kế ghi.

Nồi hấp áp lực cũng cần được trang bị một đồng hồ bấm giờ và bộ ghi nhiệt độ.

5.6.2 Sử dụng

Với nhiệt trùng hơi nước, xả hết không khí trước khi áp suất tăng lên. Nếu nồi hấp áp lực không được trang bị bộ phận tự xả, thì cần loại bỏ không khí cho đến khi luồng hơi nước được xả ra liên tục.

Để khử trùng môi trường nuôi cấy, hơi nước bao hòa trong buồng phải có nhiệt độ ít nhất $121^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ hoặc ở nhiệt độ quy định theo nhà sản xuất hoặc theo hướng dẫn hoặc quy định trong các phương pháp thử nghiệm.

Để tiêu diệt các vi sinh vật đã được nuôi cấy và khử nhiễm môi trường nuôi cấy đã được sử dụng, thì hơi nước bao hòa trong buồng phải có nhiệt độ ít nhất $121^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Trong cùng một chu trình khử trùng, không sử dụng nồi hấp áp lực để tiệt trùng các dụng cụ sạch (và/hoặc các môi trường nuôi cấy) đồng thời với khử trùng dụng cụ (và/hoặc môi trường nuôi cấy) đã qua sử dụng.

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

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

5.6.3 Bảo dưỡng

Định kỳ vệ sinh buồng của nồi hấp áp lực, bộ lọc và gioăng của nắp nồi. Kiểm tra toàn bộ gioăng nồi.

Định kỳ thực hiện xả và làm sạch, nếu cần. Thực hiện theo các khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.6.4 Kiểm tra xác nhận

Nồi hấp áp lực phải được giữ trong tình trạng hoạt động tốt và phải thường xuyên được người có thẩm quyền kiểm tra theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Giữ các dụng cụ kiểm soát trong tình trạng làm việc tốt và định kỳ kiểm tra và hiệu chuẩn.

Việc kiểm tra xác nhận ban đầu cần bao gồm các nghiên cứu hiệu năng đối với mỗi chu kỳ hoạt động và mỗi dạng khối sản phẩm được sử dụng trong thực tế. Quá trình này được lặp lại sau khi sửa chữa hoặc có sự thay đổi đáng kể. Các cảm biến nhiệt độ cần được định vị trong khối sản phẩm để chứng minh rằng nhiệt độ phân bố như nhau ở tất cả các vị trí. Việc đánh giá xác nhận và đánh giá lại cần xem xét sự phù hợp của thời gian tăng nhiệt và hạ nhiệt cũng như nhiệt độ khử trùng.

Đối với mỗi khối sản phẩm, tối thiểu cần bao gồm một chỉ thị của quá trình tại trung tâm của khối sản phẩm để kiểm tra quá trình gia nhiệt không có sẵn bàn theo dõi hiệu quả của quá trình.

5.7 Bộ phận chuẩn bị môi trường

5.7.1 Mô tả

Bộ phận chuẩn bị môi trường được thiết kế chủ yếu để khử trùng các khối lượng lớn môi trường (trên 1 lit). Thiết bị này gồm có bình gia nhiệt, túi nước và dụng cụ khuấy liên tục. Thiết bị này được trang bị một dụng cụ đo nhiệt độ, đo áp suất, bộ đếm thời gian và van an toàn.

Ngoài ra, thiết bị này cần có một khóa an toàn không cho phép mở cho đến khi nhiệt độ xuống dưới 80 °C.

5.7.2 Sử dụng

Luôn tuân thủ hướng dẫn của nhà sản xuất.

Toàn bộ quá trình thực hiện trong thiết bị. Sau khi bổ sung tất cả các thành phần, khuấy và gia nhiệt để hòa tan. Sau đó được khử trùng.

5.7.3 Bảo dưỡng

Sau khi sử dụng cho mỗi mẻ môi trường, rửa bộ phận chuẩn bị và tráng với nước tinh sạch.

5.7.4 Kiểm tra xác nhận

Bộ phận chuẩn bị môi trường phải được duy trì trong tình trạng làm việc tốt và được kiểm tra thường xuyên bởi nhân viên có năng lực theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ghi các dụng cụ theo dõi trong tình trạng làm việc tốt và xác nhận bằng cách thường xuyên hiệu chuẩn và kiểm tra.

Việc kiểm tra xác nhận ban đầu cần bao gồm các nghiên cứu hiệu năng đối với mỗi chu kỳ hoạt động và mỗi lượng môi trường thực tế sử dụng. Quá trình này được lặp lại sau khi sửa chữa hoặc thay đổi đáng kể. Có thể sử dụng hai đầu dò nhiệt độ, một tiếp giáp với đầu dò kiểm soát và một để cách xa để chứng minh độ đồng đều nhiệt độ.

Nhiệt độ và thời gian của mỗi chu kỳ cần được kiểm tra.

5.8 Tủ ấm

5.8.1 Mô tả

Tủ ấm bao gồm một buồng cách nhiệt để duy trì nhiệt độ ổn định và phân bố đồng đều; có tính đến dung sai nhiệt độ tối đa cho phép, quy định trong phương pháp thử nghiệm.

5.8.2 Sử dụng

Các tủ ấm phải được trang bị một hệ thống điều chỉnh cho phép nhiệt độ hoặc các thông số khác được lưu giữ đồng đều và ổn định trong toàn bộ thể tích làm việc. Xác định thể tích làm việc để đảm bảo đạt được kết quả tốt.

Nếu nhiệt độ môi trường xung quanh là gần hoặc cao hơn so với nhiệt độ của tủ, thì cần có hệ thống làm mát.

Thành của tủ ấm cần được bảo vệ tránh ánh nắng mặt trời.

Nếu có thể, không nên để đầy tủ trong mỗi lần hoạt động vì môi trường nuôi cấy sẽ mất một thời gian dài để cân bằng nhiệt độ, bất kể loại tủ ấm nào được sử dụng (đối lưu không khí cường bức hoặc bằng cách khác). Không mở cửa tủ trong thời gian dài.

Khi đưa sản phẩm nuôi cấy vào tủ, cần chú ý để không khí lưu thông (xem 10.2.5).

5.8.3 Làm sạch và khử trùng

Định kỳ làm sạch và khử trùng phía trong và bên ngoài tủ, nếu thích hợp, làm sạch bụi ở hệ thống thông gió.

5.8.4 Kiểm tra xác nhận

Kiểm tra sự ổn định nhiệt độ và sự phân bố nhiệt độ đồng đều trong thể tích làm việc của tủ ấm bằng cách sử dụng đồng thời một số nhiệt kế hoặc cặp nhiệt kế có độ chính xác và dải nhiệt độ thích hợp đã biết.

Sử dụng hướng dẫn trong catalog để xác định phạm vi hoạt động có thể chấp nhận được của các tủ ấm và các vị trí tối ưu của nhiệt kế hoặc cặp nhiệt kế ghi, được sử dụng để theo dõi nhiệt độ làm việc.

Ví dụ, để đạt được một nhiệt độ đích (37 ± 1) °C khi các dữ liệu hồ sơ cho thấy dải nhiệt độ từ 36,8 °C đến 37,3 °C trên tủ, thì dải nhiệt cần được giảm đến 36,2 °C đến 37,7 °C để đảm bảo tất cả các bộ phận của tủ ấm đều đạt được nhiệt độ đích là 37 °C.

Quá trình này được lặp lại sau mỗi lần sửa chữa hoặc thay đổi đáng kể.

Ví dụ kiểm tra nhiệt độ của tủ ấm có thể bằng một hoặc nhiều nhiệt kế hoặc cặp nhiệt kế tối đa và tối thiểu hoặc nhiệt kế tự ghi.

Kiểm tra nhiệt độ tủ ấm ít nhất mỗi ngày làm việc. Với mục đích này, mỗi tủ ấm phải kết hợp ít nhất một thiết bị đo có thể được ngâm trong glycerol (hoặc bình tàn nhiệt thích hợp khác). Có thể sử dụng hệ thống kiểm tra khác có hiệu quả tương đương.

5.9 Tủ lạnh, phòng bảo quản lạnh

5.9.1 Mô tả

Có các khoang cho phép duy trì việc làm lạnh. Để giữ các mẫu thực phẩm cần phân tích, thì nhiệt độ phải là (3 ± 2) °C (dung sai cho phép tối đa), trừ các ứng dụng cụ thể. Đối với các ứng dụng khác, nhiệt độ phải là (5 ± 3) °C, trừ khi có quy định khác.

5.9.2 Sử dụng

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

- môi trường chưa nuôi cây và thuốc thử;
- các mẫu thử nghiệm; và
- các chủng cây vi sinh vật và môi trường đã ủ ấm.

Việc để sản phẩm vào tủ lạnh, thiết bị làm lạnh và các phòng bảo quản lạnh phải được bố trí sao cho không khí lưu thông thích hợp và giảm thiểu khả năng lây nhiễm chéo.

5.9.3 Kiểm tra xác nhận

Trong mỗi ngày làm việc, kiểm tra nhiệt độ của từng buồng chứa, sử dụng nhiệt kế hoặc đầu dò được cài đặt cố định. Độ chính xác yêu cầu của thiết bị theo dõi nhiệt độ phụ thuộc vào mục đích của thiết bị được sử dụng.

5.9.4 Bảo dưỡng và làm sạch

Tiến hành các hoạt động bảo dưỡng sau các khoảng thời gian quy định để đảm bảo hoạt động thích hợp:

- loại bỏ bụi ra khỏi các cánh quạt của động cơ hoặc ra khỏi các tấm trao đổi nhiệt bên ngoài;
- rã đông;
- làm sạch và khử trùng bên trong các buồng chứa.

5.10 Tủ đông lạnh và tủ đông lạnh sâu

5.10.1 Mô tả

Tủ đông lạnh là buồng bảo quản sản phẩm ở trạng thái đông lạnh. Nhiệt độ phải thấp dưới -15°C , trừ khi có quy định khác, tốt nhất là dưới -18°C để bảo quản các mẫu thực phẩm.

Tủ đông sâu là buồng bảo quản sản phẩm ở trạng thái đông lạnh sâu. Nhiệt độ phải thấp dưới -70°C , trừ khi có quy định khác.

5.10.2 Sử dụng

5.10.2.1 Tủ đông lạnh

Tủ có các buồng khác nhau hoặc ít nhất là có các khoang chứa khác nhau để bảo quản riêng rẽ:

- các thuốc thử chứa nuôi cấy;
- các mẫu để phân tích; và
- các chủng cấy vi sinh vật.

Việc để sản phẩm vào tủ đông lạnh phải sao cho duy trì được nhiệt độ đủ thấp, đặc biệt là khi đưa các sản phẩm chưa đóng băng vào.

5.10.2.2 Tủ đông lạnh sâu

Sử dụng để bảo quản các vi sinh vật, các chủng cấy làm việc và/hoặc chủng cấy chuẩn và các thuốc thử.

TCVN 6404:2016

Việc để sản phẩm vào tủ đông lạnh sâu phải sao cho duy trì được nhiệt độ đủ thấp và tránh được sự nhiễm chéo giữa các vi sinh vật và thuốc thử.

5.10.3 Kiểm tra xác nhận

Định kỳ kiểm tra nhiệt độ của từng buồng sử dụng dụng cụ theo dõi nhiệt độ phù hợp.

5.10.4 Bảo dưỡng

Định kỳ thực hiện các hoạt động bảo dưỡng như sau:

- loại bỏ bụi ra khỏi các cánh quạt của động cơ hoặc ra khỏi các tẩm trao đổi nhiệt bên ngoài, nếu cần;
- rã đông;
- làm sạch và khử trùng phía trong các buồng chứa.

5.11 Bể őn nhiệt

5.11.1 Mô tả

Bể őn nhiệt, được đổ đầy chất lỏng (nước, etylen glycol v.v...), có hoặc không có nắp đậy hoặc thiết bị khác để hạn chế sự bay hơi, cần duy trì nhiệt độ quy định. Bể őn nhiệt thường chính xác hơn tủ ấm dùng không khí, cho phép dung sai tối đa là $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ hoặc tốt hơn. Nhiệt độ làm việc và dung sai tối đa cho phép được quy định, yêu cầu trong từng ứng dụng riêng lẻ hoặc trong phương pháp chuẩn. Cần có hệ thống làm mát cần thiết để duy trì nhiệt độ gần hoặc dưới nhiệt độ môi trường.

5.11.2 Sử dụng

Việc sử dụng chủ yếu như sau:

- ủ môi trường đã cây ở nhiệt độ không đổi;
- duy trì môi trường thạch tan chảy vô trùng trong quá trình chuẩn bị môi trường;
- chuẩn bị môi trường thạch tan chảy vô trùng để sử dụng trong các phương pháp chuẩn cụ thể;
- chuẩn bị các dung dịch hoặc huyền phù mẫu thử ban đầu ở nhiệt độ được kiểm soát;
- xử lý nhiệt các huyền phù mẫu thử ban đầu ở nhiệt độ được kiểm soát (ví dụ: thanh trùng Pasteur).

Khi có yêu cầu kiểm soát nhiệt độ chính xác, thì bể őn nhiệt cần được trang bị một máy bơm tuần hoàn nước và một hệ thống điều chỉnh nhiệt độ tự động. Việc xáo trộn chất lỏng cũng không làm phân tán các giọt nước.

Bể cần có nắp đậy thích hợp cho việc sử dụng ở nhiệt độ cao. Nắp có độ dốc cho phép chất ngưng tụ chảy xuống.

Để ủ các môi trường đã cấy, duy trì mức chất lỏng sao cho bề mặt của môi trường thử nghiệm ngập dưới chất lỏng ít nhất là 2 cm trong bể, trong suốt quá trình ủ.

Các vật chứa khác nhau cần được đặt trong bể ủ nhiệt sao cho mức sản phẩm đựng trong vật chứa thấp dưới mức của chất lỏng.

Không để nước lọt qua nắp vào vật chứa.

Có thể cần đến các dụng cụ, ví dụ như giá đỡ, để duy trì sự ổn định của các vật chứa.

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

5.11.3 Kiểm tra xác nhận

Kiểm tra sự ổn định và độ đồng đều của nhiệt độ trong bể ủ nhiệt, trước khi sử dụng lần đầu và sau bất kỳ lần sửa chữa hoặc thay đổi nào có ảnh hưởng đến việc kiểm soát nhiệt độ.

Theo dõi từng bể sử dụng nhiệt kế, cặp nhiệt điện hoặc dụng cụ nhiệt kế ghi nhiệt độ có độ không đảm bảo đo tối thiểu thích hợp (xem 5.28.2) và không phụ thuộc vào hệ thống điều chỉnh nhiệt độ tự động.

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng bộ hiển thị kỹ thuật số, với điều kiện là độ chính xác và độ phân giải đã được kiểm tra xác nhận.

Theo dõi nhiệt độ của bể ủ nhiệt mỗi lần sử dụng và hàng ngày trong thời gian ủ.

5.11.4 Bảo dưỡng

Bể ủ nhiệt cần được đỗ đầy chất lỏng theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Để ủ các chủng cấy, tốt nhất sử dụng nước cất hoặc nước đã khử ion.

Thường xuyên kiểm tra mức chất lỏng để đảm bảo bể hoạt động đúng và đáp ứng được các yêu cầu đối với các sản phẩm được ngâm trong bể. Mức chất lỏng phải luôn ngập trên các bộ phận làm nóng.

Bể ủ nhiệt định kỳ cần được tháo xả, làm sạch, khử trùng và đỗ đầy chất lỏng tùy thuộc vào tần suất sử dụng hoặc sau khi bị tràn.

5.12 Nồi hấp, bao gồm cả nồi cách thủy đun sôi

5.12.1 Mô tả

Nồi hấp và nồi cách thủy đun sôi gồm có bộ phận gia nhiệt được, để ngập trong nước, đựng trong một bình có nắp đậy kín. Trong nồi hấp, bộ phận gia nhiệt tạo ra hơi nước ở áp suất khí quyển; trong nồi

cách thủy đun sôi, bộ phận này làm nóng nước đến nhiệt độ hoặc gần đến nhiệt độ sôi, có tạo hoặc không tạo hơi nước.

5.12.2 Sử dụng

Việc sử dụng chủ yếu để:

- làm tan chảy môi trường thạch;
- chuẩn bị các môi trường không bền nhiệt;
- khử nhiễm các bộ phận của thiết bị giữa mỗi lần sử dụng.

Để an toàn, bình phải đủ mức nước để đảm bảo các bộ phận gia nhiệt luôn ngập trong nước.

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

5.12.3 Bảo dưỡng

Giữ sạch nồi hấp và nồi cách thủy đun sôi.

Nếu cần, định kỳ tiến hành khử cặn, tùy thuộc vào độ cứng của nước sử dụng.

5.13 Tủ sấy tiệt trùng

5.13.1 Mô tả

Tủ sấy tiệt trùng là buồng có khả năng duy trì nhiệt độ 160 °C đến 180 °C để tiêu diệt các vi sinh vật bằng nhiệt khô.

5.13.2 Sử dụng

Chỉ có các dụng cụ bằng thủy tinh và kim loại được tiệt trùng trong tủ này; không sử dụng cho các dụng cụ bằng chất dẻo và cao su.

Trước khi tiệt trùng bằng tủ, làm sạch tất cả các dụng cụ thủy tinh và kim loại trong tủ.

Nếu khử trùng dụng cụ định mức bằng thủy tinh trong tủ tiệt trùng, thì thường xuyên kiểm tra độ chính xác của dung tích được đánh dấu:

Nhiệt độ phải phân bố đồng đều trong khắp tủ. Tủ phải được trang bị một bộ ổn nhiệt và một nhiệt kế hoặc bộ ghi nhiệt độ có độ chính xác thích hợp.

Tủ cần được trang bị bộ chỉ thị về thời gian, bộ cài đặt chương trình hoặc bộ hẹn giờ.

Khi đạt được nhiệt độ hoạt động quy định, quy trình tiệt trùng phải kéo dài ít nhất 1 h ở $170^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ hoặc kết hợp thời gian/nhiệt độ tương đương.

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

5.13.3 Kiểm tra xác nhận

Kiểm tra sự ổn định và đồng đều của nhiệt độ trong khép tủ trước khi sử dụng lần đầu và sau bất kỳ lần sửa chữa hoặc thay đổi nào mà có thể có ảnh hưởng đến việc kiểm soát nhiệt độ.

Tủ được trang bị một nhiệt kế, cặp nhiệt điện hoặc bộ ghi nhiệt độ đã hiệu chuẩn có độ chính xác phù hợp, không phụ thuộc vào hệ thống điều chỉnh nhiệt độ tự động. Bộ phận theo dõi phải có độ phân giải 1°C hoặc tốt hơn ở nhiệt độ tủ được sử dụng.

Nhiệt độ của tủ cần được theo dõi và ghi lại trong mỗi lần sử dụng.

5.13.4 Bảo dưỡng

Làm sạch bề mặt phẳng trong khi cẩn.

5.14 Lò vi sóng

5.14.1 Mô tả

Lò vi sóng là thiết bị để gia nhiệt các sản phẩm bằng năng lượng vi sóng ở áp suất khí quyển.

5.14.2 Sử dụng

Sử dụng thiết bị này chỉ để làm nóng các chất lỏng hoặc làm tan chảy môi trường thạch nuôi cấy.

CẢNH BÁO – Không làm nóng môi trường có chứa các thành phần nhạy với nhiệt trong lò vi sóng, trừ khi đã được đánh giá xác nhận rằng cách này không ảnh hưởng đến hiệu năng của môi trường. Khi chưa đánh giá về hiệu quả của lò vi sóng để khử trùng môi trường nuôi cấy thì không sử dụng cho mục đích này.

Lò vi sóng phải có khả năng làm nóng các chất lỏng và môi trường nuôi cấy có kiểm soát thông qua chu kỳ phát xạ vi sóng. Sự phân bố vi sóng phải đồng đều để tránh các vùng bị quá nhiệt. Lò được trang bị bàn xoay hoặc máy khuấy để phân bổ nhiệt tốt hơn.

Không dùng dụng cụ kim loại, kẽ cát nắp đậy bằng kim loại. Nói lỏng nắp chai hoặc nút chai trước khi gia nhiệt.

Thời gian gia nhiệt kéo dài ở chế độ điện năng thấp có thể làm cho việc phân bố nhiệt tốt hơn.

CẢNH BÁO – Cẩn thận với các sản phẩm đã già nhiệt. Sản phẩm có thể quá nhiệt và bị tràn hoặc các chai có thể bị nổ.

Khi làm tan chảy môi trường thạch, nên để ở chế độ điện năng thấp (ví dụ: rã đông) và nên sử dụng cốc nước làm nóng (ví dụ: cốc dùng cho lò vi sóng đựng 50 ml đến 100 ml nước) để hỗ trợ kiểm soát quá trình già nhiệt.

Cần để ít nhất 5 min sau quá trình làm nóng, trước khi lấy ra khỏi lò vi sóng.

5.14.3 Kiểm tra xác nhận

Thiết lập thời gian già nhiệt và cài đặt điện năng thích hợp khi vận hành lần đầu đối với các lượng chất lỏng khác nhau và môi trường nuôi cấy thường xuyên được xử lý, để đảm bảo hiệu suất tối ưu và tránh quá nhiệt các sản phẩm nhạy với nhiệt.

5.14.4 Bảo dưỡng

Làm sạch lò ngay sau khi bị rò rỉ và định kỳ làm sạch tùy thuộc vào việc sử dụng.

Cần kiểm tra độ kín của vòng đệm và định kỳ kiểm tra sự rò rỉ bức xạ bằng đầu dò hoặc thiết bị tương đương khác theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

5.15 Máy rửa dụng cụ thủy tinh

5.15.1 Mô tả

Máy rửa dụng cụ thủy tinh của phòng thử nghiệm là các máy rửa được kiểm soát bằng điện, có thể được lập trình cho các chu trình rửa và tráng khác nhau (ví dụ dùng nước cất hoặc nước đã khử ion hoặc axit).

Máy rửa pipet thủy tinh là máy rửa dụng cụ thủy tinh đặc biệt được thiết kế để làm sạch bên trong pipet.

5.15.2 Sử dụng

Hiện có nhiều loại máy rửa và các loại máy này nhìn chung được lắp đặt và sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

5.15.3 Kiểm tra xác nhận

Kiểm tra hiệu quả của việc làm sạch bằng trực quan và khi cần thiết các ứng dụng quan trọng, cần thực hiện các phép thử để đảm bảo rằng các dụng cụ thủy tinh đó không chứa các chất gây ức chế.

Dư lượng xút hoặc axit có thể được kiểm tra bằng cách sử dụng dung dịch chỉ thị pH; cần đạt được độ pH trong khoảng từ 6,5 đến 7,3.

5.15.4 Bảo dưỡng

Thực hiện bảo dưỡng định kỳ theo quy định của nhà sản xuất hoặc với tần suất thích hợp.

Có thể cần thường xuyên sửa chữa khi cần đổi với các thiết bị sử dụng nhiều hoặc ở vùng nước cứng..

5.16 Kính hiển vi quang học

5.16.1 Mô tả

Có một số loại kính hiển vi khác nhau: một mắt, hai mắt có bộ phận hiển thị quan sát được, có camera hoặc dụng cụ huỳnh quang, v.v... và có nguồn ánh sáng bên trong hoặc bên ngoài. Đối với việc kiểm tra vi khuẩn, thì có thể sử dụng vật kính có độ phóng đại từ 10 lần (vật kính khô) đến khoảng 100 lần (vật kính soi dầu) để thu được độ phóng đại tổng thể từ 100 lần đến 1 000 lần. Kính hiển vi đối pha và kính hiển vi nền đen không dùng để "sol tươi".

5.16.2 Sử dụng

Điều chỉnh phần quang học của kính hiển vi theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trục quang của ánh sáng từ bóng đèn chiếu sáng cường độ cao phải đi qua tâm của bộ tụ quang dưới, bàn kính, vật kính và thị kính sao cho không xảy ra sai lệch về quang học.

5.16.3 Bảo dưỡng

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

Hàng ngày hoặc sau khi sử dụng, lau sạch vật kính soi dầu và các bộ phận liên quan bằng khăn lau kính. Sử dụng dung môi theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Định kỳ tẩy dầu cho thị kính.

Các hệ thống quang học rất dễ bị hư hỏng, do đó cần bảo dưỡng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

5.17 Đầu đốt hoặc đèn cồn

5.17.1 Mô tả

Đầu đốt khí (Bunsen) tạo ra ngọn lửa tròn hẹp từ bộ tạo khí chính hoặc khí đóng chai. Điều chỉnh lượng hỗn hợp không khí với khí để kiểm soát mức độ tạo nhiệt.

Đầu đốt bằng điện hoặc khí chủ yếu dùng để khử trùng các que cấy vòng và que cấy kim loại, bằng cách nung đến đỏ và để khử trùng bằng ngọn lửa các dụng cụ nhỏ khác.

5.17.2 Sử dụng

Đèn còn được sử dụng để khử trùng các que cấy vòng và que cấy bằng kim loại thích hợp để xử lý các vi khuẩn gây bệnh vì tránh được việc bắn tung tóe và nguy cơ lây nhiễm chéo.

Các đầu đốt khí có thể tạo ra nhiều nhiệt và nhiễu loạn không khí trong phòng thử nghiệm.

Có thể đạt yêu cầu vô trùng cách sử dụng vật liệu dùng một lần thay cho việc sử dụng đầu đốt khí.

Tránh sử dụng đầu đốt khí trong tủ bảo vệ vì có thể ảnh hưởng đến dòng khí. Trong trường hợp này, nên sử dụng các dụng cụ vô trùng dùng một lần.

5.17.3 Bảo dưỡng

Thường xuyên làm sạch và khử trùng các đầu đốt và nắp đậy của đèn còn, đặc biệt khi dịch cáy vi sinh vật bị tràn.

5.18 Bộ phân phôi môi trường nuôi cấy và thuốc thử

5.18.1 Mô tả

Bộ phân phôi này là dụng cụ hoặc thiết bị được sử dụng để phân phôi môi trường nuôi cấy và thuốc thử vào các ống nghiệm, chai lọ hoặc các đĩa Petri. Các dụng cụ này là các ống đồng, pipet hoặc xyranh thủ công, xyranh tự động, bơm nhu động, các dụng cụ kiểm soát được cài đặt bằng điện tử để phân phôi tự động.

5.18.2 Sử dụng

Các thiết bị sạch được sử dụng để phân phôi môi trường nuôi cấy và thuốc thử không được chứa các chất ức chế. Sử dụng đường ống riêng biệt cho môi trường chọn lọc để giảm thiểu việc lọc/cuốn theo của các chất đó.

Nếu cần phân phôi bằng kỹ thuật vô trùng các môi trường nuôi cấy vô trùng và thuốc thử thì tất cả các bộ phận của bộ phân phôi tiếp xúc với các sản phẩm phải vô trùng.

5.18.3 Kiểm tra xác nhận

Dung sai cho phép của bộ phân phôi môi trường nuôi cấy không được quá $\pm 5\%$ thể tích quy định.

Dung sai cho phép tối đa để phân phôi các lượng đồng đối với chất lỏng pha loãng thập phân là $\pm 2\%$.

Kiểm tra các thể tích cần phân phôi trước khi sử dụng lần đầu, sau đó kiểm tra định kỳ theo lịch trình và sau khi có sự điều chỉnh. Thông tin chi tiết có trong TCVN 7150 (ISO 835) và TCVN 10505 (ISO 8655).

5.18.4 Làm sạch và bảo dưỡng

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

Phải giữ tất cả các bộ phận tự động trong tình trạng tốt bằng cách bảo dưỡng định kỳ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

5.19 Máy trộn Vortex

5.19.1 Mô tả

Máy trộn này dùng để trộn đồng hóa môi trường lỏng (ví dụ: các dung dịch pha loãng thập phần và các mẫu thử dạng lỏng) hoặc huyền phù tế bào vi khuẩn dạng lỏng.

Việc trộn được thực hiện bằng chuyển động quay lệch tâm lượng chứa trong ống nghiệm hoặc vật chứa (tạo xoáy).

5.19.2 Sử dụng

Ánh đáy ống nghiệm hoặc vật chứa chất lỏng cần trộn vào đầu của máy trộn. Tốc độ trộn được điều khiển bằng cách thay đổi tốc độ của động cơ và góc tiếp xúc với đầu trộn.

Người vận hành phải đảm bảo rằng trong quá trình trộn sản phẩm không bị đổ ra ngoài bằng cách điều chỉnh tốc độ khi cần và giữ trong khoảng một phần ba chiều dài phía dưới ống miệng rộng để có thể kiểm soát ống tốt hơn và tránh chất lỏng dâng quá cao trong ống.

Cần có biện pháp phòng ngừa thích hợp để giảm thiểu việc tạo ra sét khí khi mở vật chứa đã trộn.

5.19.3 Kiểm tra xác nhận

Bằng chứng của việc trộn thích hợp khi nhìn thấy dòng xoáy suốt từ đáy lên bề mặt chất lỏng.

5.19.4 Bảo dưỡng

Giữ thiết bị sạch. Nếu sản phẩm bị tràn ra, thì khử nhiễm bằng cách sử dụng chất khử trùng thích hợp trong phòng thử nghiệm.

5.20 Máy đếm khuỷn lạc

5.20.1 Mô tả

Máy đếm khuỷn lạc thủ công sử dụng một bộ đếm chịu tác động của áp lực và thường cho chỉ thị âm thanh đôi với mỗi số đếm và hiển thị kỹ thuật số về số đếm tổng thể. Dụng cụ này có thể giống bút ghi hoặc có thể gồm có bàn soi được chiếu sáng với lưới đã hiệu chuẩn dùng cho đĩa đếm và màn khuếch

đại để hỗ trợ phát hiện khuẩn lạc. Thiết bị đếm khuẩn lạc điện tử tự động, kết hợp máy phân tích hình ảnh, hoạt động với sự kết hợp của các hệ thống phần cứng và phần mềm, sử dụng camera và màn hình.

5.20.2 Sử dụng

Thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉnh độ nhạy của bộ đếm tự động để đảm bảo đếm được tất cả các khuẩn lạc đích. Máy đếm khuẩn lạc điện tử tự động cũng đòi hỏi chương trình riêng biệt khi được sử dụng với các nền mẫu và các loại thạch khác nhau và đối với số đếm trên bề mặt và số đếm đĩa rót để đảm bảo đủ phân biệt các khuẩn lạc đích.

5.20.3 Kiểm tra xác nhận

Cần thường xuyên kiểm tra máy đếm khuẩn lạc thủ công để đảm bảo thu được số đếm chính xác.

Ngoài ra, đối với máy đếm khuẩn lạc tự động cần được kiểm tra trong ngày sử dụng bằng đĩa hiệu chuẩn chứa số đếm khuẩn lạc hoặc các hạt đã biết.

5.20.4 Bảo dưỡng

Giữ máy đếm sạch sẽ, không có bụi; tránh xây xước bề mặt là các yếu tố cần thiết cho quá trình đếm. Thực hiện chương trình bảo dưỡng thường xuyên máy đếm điện tử kết hợp với phân tích hình ảnh theo quy định của nhà sản xuất, ở tần suất phù hợp.

5.21 Dụng cụ nuôi cấy trong môi trường không khí cải biến

5.21.1 Mô tả

Dụng cụ này có thể là một bình được hàn kín hoặc bất kỳ thiết bị thích hợp nào khác, cho phép duy trì điều kiện không khí cải biến (ví dụ: môi trường nuôi cấy kỹ khí) trong tổng thời gian ủ ấm môi trường nuôi cấy. Có thể sử dụng các hệ thống khác có tính năng tương đương, ví dụ: tủ kỹ khí.

Lắp đặt và bảo dưỡng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

5.21.2 Sử dụng

Có thể đạt được thành phần của không khí yêu cầu bằng cách bổ sung một hỗn hợp khí (ví dụ: dùng bình khí) sau khi đuổi không khí ra khỏi bình, thay không khí trong tủ hoặc bằng bất kỳ phương tiện thích hợp khác (ví dụ: dùng các gói khí bán sẵn).

Nhìn chung, ủ kỹ khí yêu cầu không khí có ít hơn 1 % phần thể tích oxy, từ 9 % đến 13 % phần thể tích cacbon dioxit; ủ vi hiếu khí yêu cầu không khí có phần thể tích oxy từ 5 % đến 7 % và khoảng 10 % phần thể tích cacbon dioxit.

Có thể cần cải biến các điều kiện tùy thuộc vào yêu cầu của các vi sinh vật cụ thể.

5.21.3 Kiểm tra xác nhận

Đặt một chất chỉ thị sinh học hoặc hóa học để theo dõi các tính chất của môi trường không khí trong từng buồng trong mỗi lần sử dụng. Sự phát triển của chủng kiểm soát hoặc sự đổi màu của chất chỉ thị hóa học sẽ xác nhận sự thích hợp của điều kiện nuôi cấy đạt được.

5.21.4 Bảo dưỡng

Nếu có chất xúc tác, thì thường xuyên thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu có gắn các van khóa, thì làm sạch và bôi trơn để đảm bảo chúng hoạt động tốt và thay thế khi cần.

Thường xuyên làm sạch và khử trùng dụng cụ.

5.22 Máy ly tâm

5.22.1 Mô tả

Máy ly tâm là các thiết bị vận hành cơ học hoặc điện tử, có sử dụng lực ly tâm để tách các hạt lơ lửng, bao gồm cả các vi sinh vật ra khỏi chất lỏng.

5.22.2 Sử dụng

Trong một số ứng dụng, nồng độ vi sinh vật đích thu được bằng cách ly tâm mẫu chất lỏng để thu được phần lắng, sau đó làm huyền phù trong và dùng cho các phân tích tiếp theo.

Cần thực hiện biện pháp phòng ngừa để ngăn ngừa sự tạo thành sol khí và sự lây nhiễm chéo, bằng cách vận hành chính xác thiết bị và sử dụng các ống nghiệm hoặc lọ ly tâm được hàn kín và vô trùng.

5.22.3 Kiểm tra xác nhận

Khi tốc độ ly tâm trong các ứng dụng hoặc được qui định cụ thể trong ứng dụng thì cần kiểm tra thường xuyên các chỉ số tốc độ hoặc việc cài đặt theo máy đo tốc độ độc lập đã hiệu chuẩn và kiểm tra sau khi sửa chữa hoặc thay đổi đáng kể.

5.22.4 Bảo dưỡng

Làm sạch và khử trùng các máy ly tâm thường xuyên và sau khi có bất kỳ rò rỉ dịch cấy vi sinh vật hoặc có khả năng bị nhiễm từ mẫu.

Máy ly tâm cần được bảo dưỡng thường xuyên.

5.23 Bếp điện và vỏ gia nhiệt

5.23.1 Mô tả

Bếp điện và vỏ gia nhiệt là các thiết bị gia nhiệt được kiểm soát sự ổn nhiệt. Một số bếp điện và vỏ gia nhiệt có trang bị hệ thống khuấy từ.

5.23.2 Sử dụng

Bếp điện và vỏ gia nhiệt được trang bị hệ thống khuấy từ được sử dụng để làm nóng các lượng dịch lỏng như môi trường, tương đối lớn.

Không sử dụng bếp điện và vỏ gia nhiệt không có hệ thống khuấy để chuẩn bị các môi trường nuôi cấy.

5.23.3 Bảo dưỡng

Làm sạch mọi vết tràn ngay sau khi thiết bị nguội.

5.24 Đĩa cấy xoắn

5.24.1 Mô tả

Đĩa cấy xoắn là bộ phân phối để đưa một lượng chất lỏng xác định trên bề mặt đĩa thạch quay. Cánh tay phân phối di chuyển từ trung tâm của đĩa ra phía cạnh ngoài theo hình xoắn ốc Archimed. Lượng được phân phối giảm dần vì kim vạch chuyển động từ tâm ra đến mép đĩa, do đó tỷ lệ nghịch giữa lượng được phân phối với bán kính của đường xoắn ốc. Thể tích mẫu phân phối trên mọi hình quạt được biết là không đổi. Để nạp và phân phối chất lỏng, cần có nguồn chân không, một pittông có động cơ nếu thiết bị có sử dụng một microxyranh dùng một lần hoặc một hệ thống tương đương.

5.24.2 Sử dụng

Thiết bị được sử dụng để phân phối mẫu dạng lỏng, mẫu đồng nhất hoặc dung dịch pha loãng lên đĩa thạch thích hợp để xác định số đếm khuẩn lạc. Sau khi ủ, các khuẩn lạc phát triển dọc theo các đường vạch trên thạch. Số lượng khuẩn lạc trong một diện tích xác định được đếm bằng cách sử dụng lưỡi đếm được cung cấp cùng với thiết bị và tính số đếm khuẩn lạc.

Hệ thống phân phối phải được làm vệ sinh và rửa sạch bằng nước cất hoặc nước đã khử ion, trước và sau khi sử dụng và giữa mỗi mẫu. Có thể khử trùng bằng cách dội rửa bằng dung dịch chứa từ 0,5 % đến 1 % phần khối lượng clo tự do.

Thiết bị hoạt động theo nguyên tắc khác nhau (ví dụ: microxyranh có pittông dùng một lần) phải được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bề mặt các đĩa thạch được sử dụng với đĩa cấy xoắn ốc phải bằng phẳng và không có bọt khí.

Đĩa không bị quá ẩm trên bề mặt để đảm bảo hình thành các khuẩn lạc tách biệt.

Tránh sự tắc nghẽn bằng cách cho mọi chất hạt lắng xuống trước khi nạp huyền phù mẫu và sử dụng phần chất lỏng phía trên. Cũng có thể sử dụng các túi trộn có các bộ lọc.

5.24.3 Kiểm tra xác nhận

Đảm bảo rằng đĩa Petri được đặt đúng tâm bàn xoay.

Các mô hình phôi phải được kiểm tra xác nhận hàng ngày bằng sử dụng mực có thể rửa được. Các mô hình xoắn ốc phải dày đặc nhất ở gần tâm đĩa nơi vị trí bắt đầu và thưa hơn ở điểm cuối. Vòng xoắn ốc phải liên tục mà không bị ngắt. Phần rõ ràng của đĩa là trung tâm và có đường kính khoảng 2,0 cm. Vị trí của kim vạch tại điểm xuất phát và kết thúc của việc cấy phải được kiểm tra xác nhận cùng một lúc sử dụng các vạch trên bàn xoay.

Nếu mô hình là không chính xác, kim vạch cần được cắt theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Để đảm bảo đầu kim vạch ở góc chính xác với bề mặt thạch, cần thực hiện kiểm tra bằng cách sử dụng châm không để giữ lamen tý vào bề mặt kim vạch. Lamen cần giữ song song với bề mặt đĩa.

Cần kiểm tra xác nhận độ vô trùng của đĩa cấy xoắn bằng cách đỗ nước vô trùng trước khi kiểm tra từng dây mẫu.

Thường xuyên kiểm tra khối lượng của thể tích được phân phôi, sử dụng nước cắt. Dung sai cho phép tối đa đối với khối lượng dự kiến được phân phôi là $\pm 5\%$.

5.24.4 Bảo dưỡng

Bất kỳ phần mẫu bị tràn ra cần được loại bỏ ngay và thiết bị được làm sạch thường xuyên.

Thiết bị cần được bảo dưỡng và kiểm định theo mục đích sử dụng.

5.25 Thiết bị chưng cất, khử ion và thảm thấu ngược

5.25.1 Mô tả

Các thiết bị này được sử dụng để tạo ra nước cắt hoặc nước khử khoáng/khử ion có chất lượng theo yêu cầu [xem TCVN 8128 (ISO 11133)] để chuẩn bị môi trường nuôi cấy vi sinh hoặc thuốc thử và cho các ứng dụng khác trong phòng thử nghiệm khác.

5.25.2 Sử dụng

Việc lắp đặt và sử dụng trang thiết bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất, lưu ý đến vị trí của nguồn nước, chất thải và các dịch vụ điện trong phòng thử nghiệm.

5.25.3 Kiểm tra xác nhận

Nước phải được kiểm tra định kỳ hoặc sau khi lưu trữ về độ dẫn điện yêu cầu và không được lớn hơn $50 \mu\text{S}/\text{cm}$ (tương đương với điện trở $\geq 20\,000 \Omega\cdot\text{cm}$) để chuẩn bị môi trường nuôi cấy và thuốc thử.

Nếu nước được lưu trữ trước khi sử dụng hoặc được xử lý bằng thiết bị trao đổi ion, thì kiểm tra sự nhiễm khuẩn theo TCVN 8128 (ISO 11133).

5.25.4 Bảo dưỡng

Thiết bị chung cần được làm sạch và tẩy cặn bằng axit, ví dụ: axit xitric từ 5 % đến 10 % khối lượng, với tần suất phụ thuộc vào độ cứng của nước sử dụng và rửa kỹ bằng nước sạch để loại bỏ axit dư. Thiết bị khử ion và thiết bị thẩm thấu ngược cần được bảo dưỡng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

5.26 Đồng hồ và dụng cụ hẹn giờ

5.26.1 Mô tả

Đồng hồ và dụng cụ hẹn giờ là những công cụ cho phép sử dụng các khoảng thời gian chính xác có thể đổi với nhiều ứng dụng trong phòng thử nghiệm khi thời gian được quy định.

5.26.2 Sử dụng

Đồng hồ hẹn giờ cầm tay hoặc đồng hồ bàn được sử dụng để theo dõi thời gian của các hoạt động trong phòng thử nghiệm (ví dụ: dùng để nhuộm màng vi khuẩn, đồng hóa mẫu) phải trong tình trạng hoạt động tốt và có khả năng đạt được độ chính xác cần thiết.

Sử dụng bộ hẹn giờ trong thiết bị phòng thử nghiệm (ví dụ như nồi hấp áp lực, máy ly tâm, bộ đồng hóa) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các đồng hồ này phải có khả năng đạt được độ chính xác cần thiết tùy thuộc vào độ quan trọng của các ứng dụng.

5.26.3 Kiểm tra xác nhận

Thường xuyên kiểm tra tất cả các bộ hẹn giờ được sử dụng trong các hoạt động phòng thử nghiệm khi có quy định về thời gian theo giờ quốc gia và sau khi sửa chữa.

5.26.4 Bảo dưỡng

Thường xuyên làm sạch và kiểm tra các đồng hồ hẹn giờ để đảm bảo hoạt động đúng.

Các thiết bị đếm thời gian cần được kiểm tra như một phần của quy trình bảo dưỡng thiết bị.

5.27 Pipet và pipet tự động

5.27.1 Mô tả

Pipet là dụng cụ bằng thủy tinh hoặc chất dẻo dùng một lần được sử dụng để chuyển các lượng chất lỏng hoặc vật liệu dạng sệt: pipet chia độ dung để chuyển các thể tích xác định với độ chính xác phụ thuộc vào quy định kỹ thuật.

Pipet tự động (cơ học) được trang bị các đầu tip bằng chất dẻo, được dùng để chuyển các thể tích xác định hoặc các lượng có thể điều chỉnh được của chất lỏng, vận hành bằng tay hoặc điện.

5.27.2 Sử dụng

Loại bỏ các pipet bị hư hỏng hoặc bị vỡ.

Pipet Pasteur hoặc pipet chia vạch và các đầu pipet tự động cần được gắn với một nút bông không thấm nước để tránh nhiễm khuẩn khi được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật.

Các quầ bóp được sử dụng trên pipet Pasteur hoặc pipet tự động chia vạch và các đầu pipet tự động phải có các cờ chính xác để tránh rò rỉ và đảm bảo hoạt động hiệu quả.

Thông tin chi tiết có thể xem TCVN 7152 (ISO 7712).

5.27.3 Kiểm tra xác nhận

Kiểm tra các pipet chia vạch để khẳng định các thể tích chính xác khi nhận được nếu nhà sản xuất không công bố chính xác của chúng (độ đúng và độ chụm).

Việc hiệu chuẩn pipet hoặc pipet tự động được mô tả trong TCVN-7150 (ISO 835) và TCVN 10505 (ISO 8655), đặc biệt là trong TCVN 10505-2 (ISO 8655-2).

Kiểm tra các pipet tự động mới trước khi sử dụng và việc kiểm tra định kỳ phụ thuộc vào tần suất và bản chất của việc sử dụng, để chắc chắn nằm trong dung sai cho phép tối đa trong vòng 2 % đối với các thể tích dung dịch pha loãng thập phân và chất cấy (để cải thiện độ chính xác và giảm độ không đảm bảo của kết quả thử cuối cùng, dung sai cho phép tối đa $\pm 2\%$ là thích hợp hơn) hoặc 5 % đối với các ứng dụng khác. Thực hiện kiểm tra khối lượng trung gian bằng cách sử dụng nước cất hoặc nước đã khử ion để đảm bảo rằng các thể tích được phân phối vẫn nằm trong dung sai tối đa cho phép.

5.27.4 Bảo dưỡng

Khử nhiễm và làm sạch/khử trùng pipet sử dụng nhiều lần và pipet tự động sau mỗi lần sử dụng.

Nếu ống hoặc piston của pipet tự động bị nhiễm bẩn trong khi sử dụng, tháo rời để khử nhiễm và làm sạch. Sau khi lắp ráp lại, điều chỉnh lại chúng. Khi không thể thực hiện việc này trong phòng thử nghiệm, thì trả lại pipet tự động cho nhà sản xuất để lắp ráp và hiệu chỉnh lại.

5.28 Nhiệt kế và thiết bị theo dõi nhiệt độ, bao gồm cả máy ghi tự động

5.28.1 Mô tả

Nhiệt kế là phần thủy tinh có thủy ngân bên trong hoặc thủy tinh có chứa alcohol được sử dụng để theo dõi nhiệt độ trên phạm vi hoạt động của phòng thử nghiệm.

Các dụng cụ khác để theo dõi nhiệt độ bao gồm nhiệt kế điện trở platin và dụng cụ sử dụng cặp nhiệt điện để đo nhiệt độ và cung cấp bản ghi trực quan, bản in hoặc bản điện tử về dao động nhiệt độ theo thời gian.

Các nhiệt kế tham chiếu và các thiết bị theo dõi nhiệt độ khác phải được hiệu chuẩn theo tiêu chuẩn quốc gia hoặc chuẩn quốc tế. Các nhiệt kế này được sử dụng cho mục đích đối chứng và không được sử dụng để theo dõi nhiệt độ hàng ngày.

Nhiệt kế làm việc và các thiết bị ghi nhiệt độ khác phải được hiệu chuẩn sao cho có thể nối với chuẩn quốc gia hoặc chuẩn quốc tế.

CHÚ THÍCH: Các thiết bị có độ chính xác thích hợp, phù hợp với quy định kỹ thuật quốc tế hoặc quốc gia cũng có thể được sử dụng làm nhiệt kế làm việc sau khi kiểm tra xác nhận về hiệu năng của chúng.

5.28.2 Sử dụng

Nhiệt kế và các dụng cụ theo dõi nhiệt độ khác phải có độ phân giải thích hợp để đo nhiệt độ trong dung sai cho phép tối đa, tùy thuộc vào cấp độ ứng dụng.

Độ phân giải của dụng cụ theo dõi nhiệt độ phải nhỏ hơn dải dung sai cho phép tối đa ít nhất bốn lần. Ví dụ, đối với dung sai cho phép tối đa là $\pm 1^{\circ}\text{C}$ thì độ phân giải ít nhất là $0,2^{\circ}\text{C}$; với dung sai cho phép tối đa là $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ thì độ phân giải phải ít nhất là $0,1^{\circ}\text{C}$.

Cần tính đến độ không đảm bảo do của việc hiệu chuẩn nhiệt kế tham chiếu khi xác định nhiệt độ hoạt động.

Nhiệt kế hoặc cặp nhiệt kế được đặt trong tủ âm dùng không khí cần được để trong các vật chứa thích hợp đỗ đầy glycerol, parafin lỏng hoặc polypropylen glycol để đảm chống mất nhiệt khi cánh cửa được mở ra và cho số đọc ổn định. Sử dụng nhiệt kế nhúng một phần với bầu nhúng hoặc sử dụng các dụng cụ tương tự để đảm bảo sự ổn định nhiệt độ.

Các nhiệt kế đặt trong nồi cách thủy cần được ngâm trong nước phù hợp với các quy định kỹ thuật riêng rẽ, ví dụ: nhiệt kế nhúng một phần cần ngâm đến độ sâu quy định đối với nhiệt kế đó, thường là 76 mm hoặc 100 mm.

Không sử dụng nhiệt kế nếu cột thủy ngân hoặc alcohol bị vỡ.

Nhiệt kế thủy tinh chứa thủy ngân rất dễ vỡ, nếu có nguy cơ bị vỡ, nên đặt chúng trong hộp bảo vệ mà không làm ảnh hưởng đến các phép đo nhiệt độ.

CÀNH BÁO – Thủy ngân nguy hại đến sức khỏe. Loại bỏ hết phần bị vỡ theo qui định.

5.28.3 Kiểm tra xác nhận

Các nhiệt kế tham chiếu phải được hiệu chuẩn trên toàn bộ dải đo theo các chuẩn quốc gia hoặc chuẩn quốc tế trước khi sử dụng lần đầu và ít nhất 5 năm một lần. Cần thực hiện hiệu chuẩn điểm trung gian riêng (ví dụ: điểm đóng băng) để kiểm tra xác nhận hiệu năng.

Các cặp nhiệt kế tham chiếu phải được hiệu chuẩn toàn bộ theo chuẩn quốc gia hoặc chuẩn quốc tế trước khi sử dụng lần đầu, được định kỳ kiểm tra với một tần suất được phòng thử nghiệm xác định theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thực hiện kiểm tra trung gian theo nhiệt kế tham chiếu để kiểm tra xác nhận hiệu năng.

Các dụng cụ theo dõi nhiệt độ khác (ví dụ: máy thu sóng vô tuyến) phải được hiệu chỉnh theo chuẩn quốc gia hoặc chuẩn quốc tế theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

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

5.28.4 Bảo dưỡng

Duy trì các nhiệt kế và cặp nhiệt kế trong điều kiện sạch và nguyên vẹn.

Duy trì các dụng cụ theo dõi nhiệt độ khác theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

5.29 Bộ tách miễn dịch từ

5.29.1 Mô tả

Thiết bị này được sử dụng để tách và tập trung các vi sinh vật đích trong dịch cấy lỏng bằng cách sử dụng các hạt thuận từ được phủ kháng thể thích hợp.

Các bộ tách từ thủ công gồm một máy trộn quay có khả năng quay 12 r/min đến 20 r/min và một bộ côn hạt với một thanh khuấy từ có thể tháo rời.

Các bộ tách từ tự động sử dụng các mảng răng lược của các thanh từ và giá đỡ ống. Các hạt từ được chuyển từ ống này sang ống khác và cho phép thực hiện toàn bộ quy trình tách, bao gồm các giai đoạn rửa được thực hiện tự động trong môi trường khép kín.

5.29.2 Sử dụng và kiểm tra xác nhận

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

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

Đối với các hệ thống thủ công và tự động, kiểm tra để chắc chắn hệ thống có thể tách được các vi sinh vật đích ở mức thấp trước khi đưa vào sử dụng thường xuyên.

Điều quan trọng là phải đánh giá cao khả năng lây nhiễm chéo trong quá trình tách thủ công và thực hiện các bước thích hợp để tránh lây nhiễm chéo.

5.29.3 Bảo dưỡng

Kiểm tra và bảo dưỡng trang thiết bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

5.30 Hệ thống lọc

Các hệ thống lọc sử dụng được nêu trong TCVN 9716 (ISO 8199).

5.31 Các thiết bị và phần mềm khác

Các thiết bị khác và các phần mềm liên quan phải có khả năng đạt được độ chính xác yêu cầu và phải phù hợp với các quy định có liên quan đến các phép thử. Nếu có thể, lập chương trình hiệu chuẩn và kiểm tra về định lượng hoặc các giá trị khi các thuộc tính này có ảnh hưởng đáng kể đến kết quả. Trước khi sử dụng thường xuyên, hiệu chuẩn, nếu có thể và kiểm tra các thiết bị để thiết lập các yêu cầu mà phòng thử nghiệm phải đáp ứng và tuân thủ các tiêu chuẩn kỹ thuật có liên quan. Bất kỳ việc chỉnh sửa lại hoặc sửa đổi phần mềm do phòng thử nghiệm thực hiện phải được kiểm tra xác nhận để đảm bảo rằng phần mềm đã sửa đổi cho kết quả chính xác.

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

6.1 Chuẩn bị

Dụng cụ thủy tinh và các vật liệu phòng thử nghiệm khác được sử dụng trong vi sinh học phải được thiết kế phù hợp, được sử dụng đúng cách và được chuẩn bị sao cho đảm bảo độ sạch và/hoặc độ vô trùng tại thời điểm được sử dụng. Phải sử dụng loại nước dùng cho phòng thử nghiệm phù hợp với TCVN 4851 (ISO 3696)^[60] để tráng dụng cụ thủy tinh tái sử dụng sau khi rửa sạch. Có thể kiểm tra kiềm hoặc axit dư bằng cách sử dụng dung dịch chỉ thị pH; pH cần trong khoảng từ 6,5 đến 7,3.

Dụng cụ thủy tinh cần được thiết kế để ngăn ngừa hoặc hạn chế tiếp xúc giữa người thực hiện và vật liệu truyền nhiễm.

Óng và chài cần có nắp đậy thích hợp. Nếu cần, dụng cụ thủy tinh được khử trùng (ví dụ: đối với pipet) cần được đặt trong vật chứa đặc biệt hoặc được bọc bằng vật liệu phù hợp (giấy đặc biệt, lá nhôm v.v...). Dụng cụ thủy tinh cần tiệt trùng bằng hấp áp lực phải trống rỗng để hơi nước có thể tiếp cận tự do, nếu không việc khử trùng này sẽ không đạt được hiệu quả.

6.2 Tiệt trùng hoặc khử nhiễm

6.2.1 Yêu cầu chung

Nhiệt độ và thời gian tiệt trùng/khử nhiễm phải được ghi lại. Cần có cách để phân biệt giữa các vật liệu đã tiệt trùng và chưa tiệt trùng.

6.2.2 Tiệt trùng bằng nhiệt khô

Tiết trùng các dụng cụ thủy tinh, ví dụ trong lò khử trùng ít nhất 1 h ở $170^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ hoặc tương đương.

6.2.3 Tiệt trùng bằng nhiệt ẩm (hơi nước)

Hơi ẩm có áp lực là phương pháp hiệu quả nhất để tiệt trùng các dụng cụ thủy tinh và vật liệu phòng thử nghiệm. Nhiệt độ của nồi hấp áp lực phải được duy trì ở $121^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ trong ít nhất 15 min (xem 5.6).

6.2.4 Khử nhiễm bằng các hợp chất hóa học

Sử dụng các hợp chất hóa học (ví dụ: các sản phẩm chứa clo, cồn, các hợp chất amoni bậc bốn) ở nồng độ thích hợp và dễ tiếp xúc trong một thời gian phù hợp.

Đảm bảo rằng dư lượng hóa chất không ảnh hưởng đến sự phục hồi của các vi sinh vật.

6.3 Dụng cụ và vật liệu dùng một lần

Có thể sử dụng các dụng cụ và vật liệu dùng một lần thay cho các dụng cụ và vật liệu sử dụng nhiều lần (dụng cụ thủy tinh như các đĩa Petri, pipet, chai lọ, ống, que cây vòng, que dàn mẫu, v.v...) nếu các thông số kỹ thuật tương tự.

Cần kiểm tra xác nhận rằng các dụng cụ này là phù hợp để sử dụng trong phân tích vi sinh (đặc biệt là độ vô trùng) và vật liệu không chứa chất ức chế sự tăng trưởng của vi sinh vật [xem ISO 9998].

6.4 Bảo quản các dụng cụ thủy tinh và vật liệu sạch

Bảo vệ dụng cụ thủy tinh và vật liệu sạch khỏi bụi trong quá trình bảo quản, trong mọi điều kiện duy trì được độ sạch.

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

Bảo quản dụng cụ thủy tinh và vật liệu trong các điều kiện đảm bảo được độ vô trùng. Bảo quản riêng dụng cụ sử dụng một lần theo hướng dẫn của nhà sản xuất, mà không làm suy giảm chất lượng của bao bì. Bảo quản dụng cụ đã chuẩn bị trong phòng thử nghiệm trong các điều kiện sạch.

Khi tiệt trùng dụng cụ dùng cho vi sinh vật, cần ghi thời hạn sử dụng (hoặc ngày sản xuất) trên mỗi bao gói.

6.6 Khử nhiễm và khử trùng

6.6.1 Khử nhiễm dụng cụ dùng một lần

Khử nhiễm dụng cụ dùng một lần trước khi thải bỏ hoặc được bộ phận chuyên thu gom chuyển đi.

Bên cạnh các phương pháp mô tả trong điều này, có thể sử dụng lò đốt. Nếu có lò đốt, thì có thể thực hiện khử nhiễm và thải bỏ.

6.6.2 Khử nhiễm dụng cụ thủy tinh và các vật liệu trước khi sử dụng

Nhìn chung, khử nhiễm bằng cách tiệt trùng dụng cụ cần được thực hiện bằng nhiệt ẩm (xem 6.2.3) hoặc nhiệt khô (xem 6.2.2).

Trong những tình huống nhất định (ví dụ: lấy mẫu tại hiện trường), thì việc khử nhiễm bằng hóa chất có thể thích hợp. Sau khi xử lý, cần đảm bảo rằng dư lượng hóa chất không ảnh hưởng đến sự phục hồi của các vi sinh vật.

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

Vật liệu để khử nhiễm và trước khi loại bỏ cần được đặt trong các thùng chứa, ví dụ: túi chất dẻo dùng trong nồi hấp áp lực. Hấp áp lực là phương pháp tốt cho tất cả các quá trình khử nhiễm (ít nhất là 30 min ở $121^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$). Đưa sản phẩm vào nồi hấp áp lực sao cho hơi nhiệt đi vào được khối sản phẩm (ví dụ: không có bao gói ngoài và chú ý nói lồng nắp hoặc mở bao gói).

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

Hấp áp lực tất cả các dụng cụ đã tiếp xúc với các chủng cấy vi sinh (môi trường nuôi cấy đặc hoặc lỏng), kể cả vật chứa tái sử dụng trước khi rửa.

Trong quá trình kiểm tra, việc khử nhiễm bằng cách ngâm trong chất tẩy rửa mới được chuẩn bị có thể được sử dụng cho các dụng cụ có kích thước nhỏ và chịu được ăn mòn (ví dụ: pipet).

Pipet Pasteur chỉ sử dụng một lần. Thông tin chi tiết có trong TCVN 7152 (ISO 7712)^[51].

Hầu hết các chất tẩy rửa (xem Phụ lục A) có một số ảnh hưởng độc hại. Mang găng tay và kính bảo vệ mắt khi xử lý chất tẩy rửa đặc.

Các vật liệu bị nhiễm các vi sinh vật nhóm nguy cơ 3 và các vật chứa của chúng phải được hấp áp lực trước khi được thiêu hủy.

6.7 Quản lý chất thải

Thải bỏ đúng cách các vật liệu bị nhiễm không trực tiếp ảnh hưởng đến chất lượng của mẫu thử, trừ khi có khả năng lây nhiễm chéo, nhưng đó là một vấn đề của thực hành phòng thử nghiệm tốt.

Việc quản lý chất thải phải phù hợp với quy định quốc gia về sức khỏe và an toàn hoặc môi trường.

Hệ thống nhận biết và tách các vật liệu bị nhiễm và các vật chưa cần được thiết lập cho:

- Chất thải không bị nhiễm (ví dụ: mẫu thực phẩm chưa nuôi cấy) có thể được thải bỏ cùng với rác thải thông thường;
- Vật sắc nhọn, dao mổ, kim tiêm, dao, mảnh thủy tinh v.v;
- Vật liệu bị nhiễm bẩn để hấp áp lực và tái sử dụng; và
- Vật liệu bị nhiễm bẩn để hấp áp lực và tiêu hủy, hoặc để thải bỏ nếu vật liệu này không cần phải tiêu huỷ (xem các yêu cầu đặc biệt đối với vi sinh vật nhóm nguy cơ 3).

6.8 Rửa

Rửa các dụng cụ tái sử dụng chỉ sau khi đã được khử-nhiễm: Sau khi rửa, tráng dụng cụ bằng nước đã loại ion.

Có thể sử dụng các dụng cụ chuyên dụng để tạo thuận lợi cho việc làm sạch (ví dụ: dụng cụ rửa pipet, máy rửa chén, máy siêu âm).

Sau khi rửa, tráng tất cả các dụng cụ bằng nước đã loại ion và đảm bảo các dư lượng không ảnh hưởng đến sự phục hồi của các vi sinh vật. Có thể cần tráng rửa thêm hoặc kiểm tra để chắc chắn đã hết dư lượng.

7 Chuẩn bị và khử trùng môi trường nuôi cấy

Chuẩn bị và khử trùng môi trường nuôi cấy theo TCVN 8128 (ISO 11133).

8 Mẫu phòng thử nghiệm

8.1 Lấy mẫu

8.1.1 Yêu cầu chung

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

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

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

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

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

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

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

8.1.2 Phương án lấy mẫu

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

8.2 Vận chuyển

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

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

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

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

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

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

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

- sản phẩm "không dễ phân huỷ": nhiệt độ phòng (dưới 40 °C);
- sản phẩm đông lạnh và đông lạnh sâu: dưới -15 °C, tốt nhất là dưới -18 °C;
- các sản phẩm khác dễ phân huỷ ở nhiệt độ môi trường: từ 1 °C đến 8 °C;
- các mẫu tăm bông, xem TCVN 8129 (ISO 18593) và TCVN 7925 (ISO 17604).

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

8.3 Tiếp nhận

Kiểm tra trạng thái của mẫu khi tiếp nhận..

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

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

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

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

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

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

Các thông tin sau cần phải ghi:

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

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

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

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

Đối với các mẫu dễ hỏng (như cá, sữa nguyên liệu) thi kiểm tra trong vòng 36 h.

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

8.4 Bảo quản

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

Nhiệt độ bảo quản được khuyến cáo như sau:

- sản phẩm không dễ phân huỷ: nhiệt độ môi trường (từ 18 °C đến 27 °C);
- sản phẩm đông lạnh và đông lạnh sâu: dưới -15 °C, tốt nhất là dưới -18 °C;
- các sản phẩm khác dễ phân huỷ ở nhiệt độ môi trường, kể cả thực phẩm bị hỏng: từ 3 °C ± 2 °C [xem TCVN 6507-2 (ISO 6887-2) đến TCVN 6507-5 (ISO 6887-5)];
- các mẫu tăm bông, xem TCVN 8129 (ISO 18593) và TCVN 7925:2008 (ISO 17604:2003).

8.5 Phần mẫu thử

8.5.1 Nguyên tắc cụ thể để lấy các phần mẫu thử

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

8.5.2 Bảo quản và phân huỷ các mẫu phòng thử nghiệm

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

Các mẫu dễ bị hỏng cần được làm đông lạnh.

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

9 Kiểm tra

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- a) đảm bảo rằng khu vực làm việc sạch, tất cả các nguồn có khả năng gây nhiễm bẩn phải được loại bỏ hoặc giảm đến mức tối thiểu và không có gió lùa (cửa chính và cửa sổ phải đóng lại) và tránh người qua lại trong khi thử nghiệm;
- b) trước và sau khi làm việc, khử nhiễm bề mặt thao tác bằng chất sát trùng thích hợp;
- c) đảm bảo rằng trước khi bắt đầu tiến hành công việc tất cả các thứ cần thiết đã được chuẩn bị sẵn;
- d) thực hiện phân tích ngay;
- e) tách riêng các hoạt động "sạch" và "bẩn" theo thời gian hoặc vị trí (điều này rất quan trọng với các mẫu có nguy cơ cao như thịt nguyên liệu và trứng nguyên liệu);
- f) dùng dụng cụ sử dụng một lần;
- g) nếu toàn bộ lượng chứa trong bao gói được lấy bằng pipet sử dụng một lần, đĩa petri v.v...không được sử dụng trong quá trình kiểm tra thì đảm bảo rằng bao gói được đóng kín sau khi lấy một lượng cần thiết;
- h) lau sạch ngay mọi rò rỉ bằng khăn bông hoặc vật liệu thích hợp khác tẩm cồn 70 % (thể tích) hoặc chất tẩy trùng ¹⁾ thích hợp khác rồi làm sạch và khử nhiễm bề mặt làm việc trước khi tiếp tục;
- i) sử dụng tủ an toàn để xử lý các sản phẩm chứa các vi khuẩn gây bệnh; nếu quy định quốc gia yêu cầu;

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

j) khi lấy pipet vô trùng ra khỏi hộp, không để đầu tip chạm vào các bề mặt bên ngoài của các pipet còn lại trong hộp vì các bề mặt đó sẽ gây nhiễm bẩn;

k) không để pipet tiếp xúc với nắp hoặc cổ của chai đựng dung dịch;

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

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

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

Đối với các phương pháp phân tử, cần lưu ý tới các phòng ngừa theo TCVN 11134 (ISO 22174).

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

9.2.1 Yêu cầu chung

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

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

9.2.2 Cô đặc

9.2.2.1 Ly tâm hoặc lọc màng

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

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

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

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

9.2.2.2 Tách miễn dịch

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

Dàn đều các hạt cùng với các vi sinh vật mục tiêu bắt được, trực tiếp lên thạch đặc đặc hiệu theo các tiêu chuẩn đặc thù. Tuy nhiên, kiểm tra xác nhận cho thấy rằng các hạt từ miễn dịch đã được phủ các kháng thể đặc hiệu cho bước cô đặc này là thích hợp, như được đánh giá bằng các nghiên cứu đã xuất bản trong tài liệu khoa học quốc tế, liên quan đến vi sinh vật trong thực phẩm. Việc kiểm tra này rất quan trọng nếu quy trình này chưa được đánh giá theo ISO 16140-2.

10 Định lượng

10.1 Yêu cầu chung

Khi đánh giá chất lượng vi sinh và/hoặc an toàn của thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, thường không biết được hết các vi sinh vật có mặt. Trong hầu hết các trường hợp, việc định lượng là quan trọng. Điều này có thể đạt được bằng nhiều cách khác nhau: kiểm tra trực tiếp (kính hiển vi), bằng cách cấy truyền sang môi trường đặc hoặc lỏng, đếm tế bào, phản ứng polymerase tức thời, v.v... Tuy nhiên, tiêu chuẩn này chỉ bao gồm việc định lượng bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy đặc và lỏng.

Việc định lượng trên môi trường đặc dựa vào khả năng của các vi sinh vật sinh khuẩn lạc bên trong hoặc trên môi trường thạch có thể được nhận diện bằng mắt thường hoặc sử dụng kính lúp đơn giản.

Nếu nền mẫu chứa các chất hạt gây nhiễu ở một mức cao, thì trước tiên chúng phải được tách bằng cách để lắng hoặc sử dụng túi lọc.

Nếu vi khuẩn dự kiến ở mức rất thấp (nhỏ hơn 10 khuẩn lạc bên trong hoặc trên đĩa thạch ở độ pha loãng thấp nhất), thì nên định lượng bằng cách sử dụng môi trường lỏng khuyến cáo (ví dụ: phương pháp MPN) để cải thiện độ tin cậy của các kết quả thống kê (xem Phụ lục B và C). Có thể sử dụng phương pháp cô đặc bằng cách lọc, tách ái lực hoặc ly tâm.

10.2 Định lượng bằng môi trường đặc

10.2.1 Yêu cầu chung

Đĩa Petri phải được dán nhãn ghi rõ số lượng mẫu, độ pha loãng, ngày tháng và mọi thông tin cần thiết khác.

Cần chọn các dung dịch pha loãng để đảm bảo các đĩa chứa số lượng khuẩn lạc thu được thích hợp (xem 10.3.1) và để khắc phục được mọi thuộc tính ức chế có thể có.

Sử dụng một pipet vô trùng riêng để chuyển từng dung dịch pha loãng, trừ khi thực hiện bắt đầu từ dung dịch có độ pha loãng cao nhất đến dung dịch có độ pha loãng thấp nhất.

CHÚ THÍCH: Điều này áp dụng cho các trường hợp chung của các độ pha loãng thập phân 10^{-1} , nhưng cũng áp dụng cho các dạng dung dịch pha loãng khác (ví dụ: độ pha loãng 1 đến 5 lần hoặc 1 đến 2 lần).

10.2.2 Số đĩa Petri cho mỗi độ pha loãng

Đối với các kỹ thuật định lượng vi sinh vật trong thực phẩm, sử dụng một đĩa cho một độ pha loãng với ít nhất hai độ pha loãng liên tiếp. Có thể sử dụng hai đĩa cho mỗi độ pha loãng để tăng độ tin cậy.

Nếu chỉ sử dụng một độ pha loãng, thì dùng hai đĩa cho độ pha loãng này theo Phụ lục D để tăng độ tin cậy của các kết quả.

Đối với các phòng thử nghiệm không hoạt động theo nguyên tắc đảm bảo chất lượng, thì phải sử dụng hai đĩa cho mỗi độ pha loãng theo Phụ lục D để tăng độ tin cậy của các kết quả.

10.2.3 Kỹ thuật đỗ đĩa

Lấy ra các thỏi tích xác định của dung dịch pha loãng cần kiểm tra, chạm đầu pipet vào thành ống nghiệm để loại bỏ chất lỏng dư bám bên ngoài. Nhắc nắp đĩa Petri vô trùng đủ cao để đưa pipet vào rồi xả hết lượng chứa trong pipet.

Sau khi lấy môi trường thạch ra khỏi nồi cách thủy, thảm khô chai bằng khăn sạch để tránh nước làm nhiễm vào đĩa. Tránh làm rớt môi trường ra phía ngoài vật chứa hoặc phía trong nắp đĩa khi đỗ. Để tránh nhiễm bẩn môi trường nuôi cấy, giữ chai gần như nằm ngang và cũng không đặt chai xuống giữa các bước đỗ đĩa. Đỗ môi trường thạch đã tan chảy ở nhiệt độ 44°C đến 47°C vào từng đĩa Petri (thường từ 18 ml đến 20 ml thạch cho đĩa Petri đường kính 90 mm và từ 45 ml đến 50 ml cho đĩa Petri đường kính 140 mm, để có được thạch dày ít nhất là 3 mm) trong vòng 15 min nuôi cấy (để tránh các khuẩn lạc kết dính). Tránh đỗ trực tiếp thạch tan chảy vào chất cấy. Cần thận trọng môi trường tan chảy với chất cấy để thu được sự phân bố đồng đều của các vi sinh vật trong môi trường, ví dụ: nhẹ nhàng xoay tròn đĩa theo hai chiều trái-phải. Để nguội và làm đông đặc bằng cách đặt các đĩa Petri trên mặt phẳng ngang (thời gian đông đặc của thạch không được vượt quá 10 min).

Nếu dự kiến có mặt các khuẩn lạc mọc lan (ví dụ: *Proteus spp.*) trong sản phẩm cần kiểm tra, thì phủ trên đĩa thạch đã đóng đặc một lớp thạch không dinh dưỡng vô trùng hoặc thạch giống với môi trường nuôi cấy được sử dụng trong phép thử nghiệm (thường dùng 5 ml thạch cho đĩa Petri đường kính 90 mm), để ngăn ngừa hoặc giảm thiểu mọc lan.

10.2.4 Nuôi cấy bề mặt

10.2.4.1 Yêu cầu chung

Các phương pháp cấy bề mặt được thiết kế để tạo các khuẩn lạc bề mặt trên các đĩa thạch có một số ưu thế nhất định so với các phương pháp đỗ đĩa. Hình thái của các khuẩn lạc bề mặt có thể dễ dàng quan sát, cải thiện khả năng của người phân tích để phân biệt giữa các kiểu khuẩn lạc khác nhau. Có thể thu được số đếm cao của các vi sinh vật không tiếp xúc với nhiệt của môi trường thạch nóng chảy.

Sử dụng các đĩa rót sẵn môi trường thạch có bề dày ít nhất 3 mm, bằng phẳng, không có bọt khí và ẩm bề mặt.

Để thuận tiện cho việc dàn đều, bề mặt thạch đã đóng đặc cần được làm khô theo TCVN 8128 (ISO 11133) hoặc theo quy định trong các tiêu chuẩn có liên quan sao cho chất cấy hấp thụ được trong vòng 15 min.

10.2.4.2 Phương pháp cấy trài

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

Giới hạn định lượng có thể được hạ xuống 10 lần bằng cách lấy 1,0 ml mẫu thử dạng lỏng hoặc 1,0 ml huyền phù ban đầu khi sản phẩm ở dạng khác, cấy trên bề mặt một đĩa thạch lớn (140 mm) hoặc trên bề mặt ba đĩa thạch nhỏ (90 mm). Trong cả hai trường hợp, nếu chỉ sử dụng một độ pha loãng, thì chuẩn bị hai đĩa lớn hoặc sáu đĩa nhỏ.

Sử dụng que dàn mẫu bằng thủy tinh, bằng chất dẻo hoặc bằng thép (ví dụ: bằng que thuỷ tinh đường kính 3,5 mm và dài 20 cm, được uốn vuông góc một đầu với dài khoảng 3 cm và được làm nhẵn bằng cách nung nóng), dàn đều chất cấy càng nhanh càng tốt trên bề mặt thạch mà không chạm vào thành đĩa Petri. Đậy nắp đĩa và để yên cho chất cấy hấp thụ trong khoảng 15 min ở nhiệt độ phòng.

Trong một số trường hợp cụ thể (như đã nêu trong các tiêu chuẩn có liên quan), chất cấy có thể được đưa lên màng sau đó được dàn đều như trên.

10.2.4.3 Phương pháp đĩa cây xoắn

10.2.4.3.1 Yêu cầu chung

Các phương pháp đĩa cây xoắn để xác định mức vi sinh vật đã được thử nghiệm trong các phép thử nghiệm liên phòng với sữa và sản phẩm sữa và các thực phẩm khác.

Các thiết bị sử dụng – đĩa cây xoắn – được mô tả trong 5.24.

10.2.4.3.2 Chuẩn bị đĩa thạch

Nên dùng bộ phân phôi tự động với hệ thống phân phôi vô trùng để chuẩn bị các đĩa thạch, để đảm bảo độ dày đồng đều phù hợp, không có bọt khí và vô trùng.

Rót một lượng thạch nhũ nhau vào tất cả các đĩa sao cho có cùng một chiều cao thạch trong đĩa cây xoắn để kim vạch duy trì góc tiếp xúc chính xác.

Làm khô đĩa thạch đã đổ (mặt thạch) [xem TCVN 8128 (ISO 11133)] trước khi sử dụng và đảm bảo không có các giọt nước trên bề mặt môi trường.

10.2.4.3.3 Quy trình đỗ đĩa và đếm

Khử nhiễm đầu kim cây và đường ống bằng cách hút dung dịch natri hypoclorit trước tiên (xem 5.24.4), sau đó bằng nước vô trùng qua hệ thống trước khi lấy mẫu dạng lỏng. Cách khác, dùng xyranh sử dụng một lần trong các thiết bị khi được trang bị.

Đặt đĩa thạch rót sẵn vào đĩa Petri trên bàn xoay và hạ thấp kim cây. Các mẫu được phân tán theo đầu kim cây trên bề mặt thạch xoay. Lấy đĩa đã cây ra và đặt kim vạch trở về vị trí xuất phát. Khử nhiễm kim cây hoặc thay microxyranh và cây các đĩa khác.

Đậy nắp đĩa, để yên cho chất cây hấp thụ trong thời gian không quá 15 min ở nhiệt độ môi trường, sau đó ủ (xem 10.2.5).

Sau khi ủ, đặt lưỡi đếm đĩa cây xoắn vào giữa đĩa. Chọn hình quạt bất kì và bắt đầu đếm các khuỷn lạc từ mép ngoài của hình vành khăn thứ nhất về phía tâm cho đến khi đếm được 20 khuỷn lạc. Kết thúc việc đếm khuỷn lạc còn lại trong hình vành khăn chứa khuỷn lạc thứ 20. Đếm các hình vành khăn tương ứng của hình quạt đối diện và chia số lượng khuỷn lạc đếm được trên hai mặt cho thể tích mẫu đưa vào hai phần diện tích này. Lượng của mẫu liên quan đến mỗi phần của lưỡi đếm được nêu trong hướng dẫn vận hành kèm theo thiết bị.

10.2.5 Ủ

Lật úp các đĩa ngay sau khi đã cây xong, đặt nhanh vào tủ ấm ở nhiệt độ thích hợp, trừ khi được quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể. Nếu bị mất nước quá mức (ví dụ: ở nhiệt độ 55 °C hoặc trong trường

hợp không khí lưu thông mạnh), gói đĩa lỏng trong các túi chất dẻo trước khi ủ hoặc sử dụng hệ thống tương tự có hiệu quả tương đương.

Trong suốt thời gian ủ ấm, có thể tránh khỏi sự thay đổi nhỏ về nhiệt độ ủ nhưng có thể chấp nhận được, ví dụ: khi mở tủ đưa đĩa vào hoặc lấy đĩa ra, nhưng cần giữ ở mức thay đổi tối thiểu. Thời gian dao động nhiệt độ này cần được theo dõi để đảm bảo rằng không ảnh hưởng đáng kể đến kết quả.

Đôi khi nó có thể hữu ích cho các thao tác trong phòng thử nghiệm để làm lạnh các đĩa đã nuôi cấy trước khi ủ không quá 24 h. Nếu vậy, phòng thử nghiệm phải đảm bảo rằng điều này không ảnh hưởng đến kết quả số đếm.

Nhìn chung, các đĩa Petri cần xếp chồng lên nhau không quá sáu đĩa để ủ hiệu khí và cần để xa nhau và xa thành tủ ấm ít nhất 25 mm. Tuy nhiên, đối với tủ ấm có gắn hệ thống tuần hoàn không khí có thể chồng cao hơn với khoảng trống ít cũng có thể được chấp nhận, trong trường hợp này cần kiểm tra xác nhận sự phân bố nhiệt độ.

Sau khi ủ, các đĩa thường được kiểm tra ngay. Tuy nhiên, có thể được bảo quản đến 48 h trong tủ lạnh, trừ khi có quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể. Việc bảo quản trong tủ lạnh có thể chấp nhận được nếu đã được chứng minh rằng không ảnh hưởng đến số lượng, về bề ngoài hoặc việc khống định tiếp theo của các khuẩn lạc. Với các môi trường nuôi cấy nhất định có chứa các chất nhuộm chỉ thị, thì các đĩa đã làm lạnh cần được cân bằng đến nhiệt độ phòng trước khi kiểm tra để đảm bảo màu sắc trở lại màu ban đầu.

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

10.3.1 Đếm các khuẩn lạc

Sau giai đoạn ủ như quy định trong tiêu chuẩn cụ thể, đếm các khuẩn lạc (tổng số khuẩn lạc, các khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc giả định) đối với từng đĩa có chứa đến và bao gồm 300 khuẩn lạc (hoặc số bất kỳ số lượng khác được nêu trong tiêu chuẩn cụ thể).

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

Trong một số trường hợp, có thể khó để đếm các khuẩn lạc (ví dụ: có mặt các vi sinh vật mọc lan). Coi các khuẩn lạc mọc lan là các khuẩn lạc đơn lẻ. Nếu ít hơn một phần tư đĩa nhiều khuẩn lạc mọc lan, thì đếm những khuẩn lạc trên một phần không bị ảnh hưởng và tính bằng cách ngoại suy số đếm lý thuyết của các khuẩn lạc cho toàn bộ đĩa. Nếu có nhiều hơn một phần tư đĩa có khuẩn lạc mọc lan thì bỏ không đếm. Coi một chuỗi các khuẩn lạc là một đơn vị hình thành khuẩn lạc.

CHÚ THÍCH: Trong một số trường hợp, có thể hữu ích khi bảo quản các đĩa đã cấy ở $(3 \pm 2) ^\circ\text{C}$ để sử dụng trong so sánh với các đĩa đã cấy và ủ trong khi đếm, để tránh đếm nhầm các hạt của sản phẩm là khuẩn lạc. Cũng có thể dùng kính lúp để phân biệt các hạt sản phẩm với các khuẩn lạc.

Có các phương pháp tính được nêu trong 10.3.2. Phụ lục B và Phụ lục D có tính đến các trường hợp đặc biệt và cung cấp thông tin về các khoảng tin cậy.

Trong các phương pháp tính toán khác nhau, cần phải tính đến các đĩa không chứa các khuẩn lạc nào trong các đĩa đã được giữ lại, vì khi tính trung bình khối lượng của các đĩa này là không đáng kể.

Khi sử dụng đĩa cấy xoắn, đếm khuẩn lạc theo 10.2.4.3.3.

10.3.2 Biểu thị kết quả

10.3.2.1 Yêu cầu chung

10.3.2.1.1 Các trường hợp có liên quan đến điều này thường là:

- cấy một đĩa Petri đường kính 90 mm cho mỗi độ pha loãng và thực hiện ít nhất là hai độ pha loãng liên tiếp;
- số đếm tối đa đối với tổng số các khuẩn lạc có mặt: 300 trên mỗi đĩa;
- tổng số khuẩn lạc tối đa (điển hình và không điển hình) có mặt trên mỗi đĩa khi đếm khuẩn lạc điển hình hoặc giả định: tốt nhất là 300 trên mỗi đĩa;
- số đếm tối đa đối với khuẩn điển hình hoặc giả định: 150 trên mỗi đĩa;
- số khuẩn lạc giả định được cấy để nhận biết hoặc khẳng định (xem 10.3.2.3) trong mỗi đĩa được giữ lại: thường là 5.

Những con số này được xác định trong các tiêu chuẩn cụ thể. Đối với các vi sinh vật sinh tạo các khuẩn lạc rộng thì số lượng tối đa của các khuẩn lạc trong đĩa được quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể.

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

Ví dụ:

- Đối với các đĩa rót có đường kính 55 mm, thì số đếm tối đa của các khuẩn lạc phải là 110 (tương đương với tổng số đếm 300 cfu trên đĩa Petri đường kính 90 mm).
- Đối với đĩa có đường kính 140 mm thì số đếm tối đa các khuẩn lạc phải là 730 (tương đương với tổng số 300 cfu trên đĩa Petri đường kính 90 mm).

10.3.2.1.2 Các phương pháp tính được nêu dưới đây là dành cho các trường hợp thường gặp khi thực hiện thử nghiệm phù hợp với thực hành phòng thử nghiệm tốt. Trường hợp đặc biệt có thể xảy ra (ví dụ: tỷ lệ các hệ số pha loãng được sử dụng cho hai độ pha loãng liên tiếp có thể rất khác nhau), do đó, có thể cần có người phân tích vi sinh có trình độ chuyên môn kiểm tra và diễn giải về việc đếm các kết quả thu được, nếu cần, có thể loại bỏ.

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

Để kết quả có giá trị, thường cần đếm các khuẩn lạc trên ít nhất một đĩa có chứa ít nhất 10 khuẩn lạc [tổng số các khuẩn lạc, khuẩn lạc điển hình hoặc các khuẩn lạc phù hợp với các tiêu chí xác định (xem 10.3.2.3)].

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

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

Trong đó:

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

V là thể tích chất cấy được đưa vào mỗi đĩa, tính bằng mililit (ml);

d là độ pha loãng tương ứng với dung dịch pha loãng đầu tiên được giữ lại [$d = 1$ khi sản phẩm dạng lỏng chưa pha loãng (mẫu thử) được giữ lại].

Nếu có nhiều hơn một độ pha loãng được sử dụng, tỷ lệ giữa số đếm khuẩn lạc của dung dịch pha loãng d_2 và số đếm khuẩn lạc của dung dịch pha loãng d_1 dự kiến là 10 %. Các giới hạn trên và giới hạn dưới cần được các phòng thử nghiệm quy định đối với số đếm khuẩn lạc của dung dịch pha loãng d_2 . Ví dụ, các giới hạn này có thể có trong TCVN 9330-2 (ISO 14461-2)^[42]. Khi không tuân thủ các giới hạn này thì cần diễn giải kết quả một cách thận trọng.

VÍ DỤ: Nếu số đếm khuẩn lạc của dung dịch pha loãng d_1 là 250, thì số đếm khuẩn lạc của dung dịch pha loãng d_2 không được nhỏ hơn 13 (5,2 %) và không lớn hơn 39 (15,8 %). Xem TCVN 9330-2 (ISO 14461-2).

Làm tròn kết quả tính được đến hai chữ số sau dấu phẩy. Khi làm tròn, nếu con số thứ ba nhỏ hơn 5 thì không sửa đổi các con số trước đó, còn nếu con số thứ ba lớn hơn hoặc bằng 5 thì tăng con số trước lên một đơn vị.

Tốt nhất là biểu thị kết quả theo con số từ 1,0 đến 9,9 nhân với lũy thừa 10 hoặc số nguyên với hai chữ số thập phân.

Báo cáo kết quả là số lượng N vi sinh vật trên millilit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (sản phẩm ở dạng khác).

Ví dụ: Số đếm cho các kết quả như sau:

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

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

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

Làm tròn kết quả như đã nêu ở trên, số lượng vi sinh vật là 17 000 hoặc $1,7 \times 10^4$ trên millilit hoặc trên gam sản phẩm.

10.3.2.3 Phương pháp tính: sau khi nhận biết

Khi phương pháp được sử dụng yêu cầu nhận biết, thì số lượng khuẩn lạc giả định A đã cho (thường là 5) được nhận biết từ mỗi đĩa được giữ lại để đếm khuẩn lạc. Sau khi nhận biết, tính số khuẩn lạc a , của mỗi đĩa theo các tiêu chí xác định, sử dụng Công thức (2):

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

Trong đó:

b là số khuẩn lạc đáp ứng tiêu chí nhận biết trong số các khuẩn lạc được nhận biết A ;

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

Làm tròn kết quả tính được đến số nguyên gần nhất. Khi làm tròn, nếu con số đầu tiên sau dấu thập phân nhỏ hơn 5, thì giữ nguyên con số ngay trước đó; Nếu con số đầu tiên ngay sau dấu thập phân bằng hoặc lớn hơn 5 thì tăng con số đứng trước lên một đơn vị.

Tính số lượng N , N_E hoặc N' của các vi sinh vật được nhận biết hoặc được khẳng định có trong mẫu thử bằng cách thay $\sum C$ bằng $\sum a$ trong Công thức nêu trong 10.3.2.2 hoặc thay C bằng a trong các Công thức nêu trong 10.3.2.4.1 và 10.3.2.5.3. Làm tròn kết quả theo quy định trong 10.3.2.2.

Biểu thị kết quả theo quy định trong 10.3.2.2, 10.3.2.4.1 và 10.3.2.5.3, tương ứng.

Ví dụ: Số đếm cho các kết quả như sau:

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

- Ở độ pha loãng thứ hai giữ lại (10^{-4}): 4 khuẩn lạc

Việc thử nghiệm các khuẩn lạc được chọn đã được thực hiện:

- 66 khuẩn lạc, 8 khuẩn lạc đã được thử nghiệm, 6 trong số đó đáp ứng tiêu chí, do đó $a = 50$:
- 4 khuẩn lạc, tất cả 4 khuẩn lạc đều đáp ứng tiêu chí, do đó $a = 4$.

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

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

10.3.2.4 Phương pháp tính: số đếm thấp

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

Các số đếm từ 10 đến giới hạn trên của từng phương pháp nằm trong dải độ chụm tối ưu. Độ chụm giảm nhanh theo số lượng khuẩn lạc giảm xuống dưới 10. Tuy nhiên, tùy thuộc vào mục đích phép thử, mà giới hạn dưới của phép xác định có thể được xác định như dưới đây đối với các số đếm dưới 10.

Theo tiêu chuẩn ISO/TR 13843^[40], định nghĩa về giới hạn của phép xác định là: "Nồng độ chất hạt trung bình thấp nhất x trên phần mẫu phân tích, trong đó độ không đảm bảo chuẩn tương đối dự kiến bằng giá trị quy định (RSD). Thuật ngữ "hệ số biến thiên" hiện có liên quan đến RSD. Hệ số biến thiên, Cv được tính bằng cách chia ước lượng độ lệch chuẩn s cho giá trị trung bình \bar{x} của mẫu đó. Như vậy,

$$C_v = \frac{s}{\bar{x}}$$

Trong trường hợp phân bố Poisson, x được tính bằng Công thức (3):

$$x = \frac{1}{C_v^2} \quad (3)$$

Nếu Cv được thiết lập ở mức 50 % theo mức giới hạn của độ chụm tương đối chấp nhận được (hợp lý trong phân tích vi sinh), thì giới hạn dưới của phép xác định sẽ có số khuẩn lạc như sau:

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

Như vậy, các kết quả dựa trên các số đếm nhỏ hơn bốn cần được xử lý chỉ là phát hiện được sự có mặt của vi sinh vật.

Kết luận:

Nếu các đĩa chứa ít hơn 10 khuẩn lạc, nhưng có ít nhất là bốn, thì tính toán kết quả như sau:

$$N_E = \frac{C}{V \times d}$$

và báo cáo là có số ước tính N_E vi sinh vật trên millilit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (sản phẩm ở dạng khác).

CHÚ THÍCH: Thuật ngữ "số ước tính" có nghĩa là ước tính giá trị thực ít chính xác hơn.

Nếu tổng số là từ 3 đến 1, thì độ chênh của kết quả là quá thấp và kết quả sẽ được báo cáo là:

"Có mặt các vi sinh vật nhưng ít hơn 4/Vd trên gam hoặc trên millilit".

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

Nếu đĩa có chứa mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) hoặc dung dịch pha loãng thứ nhất được nuôi cấy hoặc được giữ lại không chứa bất kỳ khuẩn lạc nào, thì báo cáo kết quả như sau:

"ít hơn 1/Vd vi sinh vật trên một millilit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc

"ít hơn 1/Vd vi sinh vật trên một gam" (sản phẩm dạng khác).

Trong đó:

d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu hoặc của dung dịch loãng thứ nhất được nuôi cấy hoặc được giữ lại ($d = 10^0 = 1$ khi mẫu thử dạng lỏng nuôi cấy trực tiếp được giữ lại);

V là thể tích chất cấy được sử dụng cho mỗi đĩa, tính bằng millilit (ml).

10.3.2.4.3 Trường hợp đặc biệt

10.3.2.4.3.1 Yêu cầu chung

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

10.3.2.4.3.2 Trường hợp 1

Nếu số khuẩn lạc điển hình và không điển hình đối với đĩa có chứa dung dịch pha loãng thứ nhất d_1 , lớn hơn 300 (hoặc số bất kỳ khác được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể), với các khuẩn lạc điển hình có thể nhìn thấy hoặc khuẩn lạc được khẳng định và nếu đĩa có chứa dung dịch pha loãng tiếp theo d_2

chứa nhỏ hơn hoặc bằng 300 khuẫn lạc (hoặc số bất kỳ khác được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể) và khuẫn lạc không điển hình có thể nhìn thấy hoặc được khẳng định, thì báo cáo kết quả như sau:

- "ít hơn $1/V_2 d_2$ và nhiều hơn $1/V_1 d_1$ vi sinh vật trên mililit (sản phẩm dạng lỏng); hoặc
- "ít hơn $1/V_2 d_2$ và nhiều hơn $1/V_1 d_1$ vi sinh vật trên gam" (sản phẩm dạng khác)

Trong đó:

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

V_1 là thể tích chất cấy được sử dụng trong đĩa chứa dung dịch pha loãng thứ nhất d_1 , tính bằng mililit (ml).

V_2 là thể tích chất cấy được sử dụng cho đĩa chứa dung dịch pha loãng tiếp theo d_2 , tính bằng mililit (ml).

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

- ở độ pha loãng thứ nhất giữ lại (10^{-2}): lớn hơn 300 khuẫn lạc trên đĩa, có mặt các khuẫn lạc điển hình hoặc các khuẫn lạc đã khẳng định;
- ở độ pha loãng thứ hai giữ lại (10^{-3}): 33 khuẫn lạc, có mặt các khuẫn lạc không điển hình hoặc các khuẫn lạc đã khẳng định.

Biểu thị kết quả là ít hơn 1 000 vi sinh vật và nhiều hơn 100 vi sinh vật trên mililit hoặc trên gam sản phẩm.

10.3.2.4.3.3 Trường hợp 2

Nếu số khuẫn lạc điển hình và không điển hình đối với đĩa chứa dung dịch pha loãng thứ nhất d_1 là lớn hơn 300 (hoặc số bất kỳ khác được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể), không có các khuẫn lạc điển hình có thể nhìn thấy hoặc khuẫn lạc đã được khẳng định và nếu đĩa chứa dung dịch pha loãng tiếp theo d_2 chứa đến và bao gồm 300 khuẫn lạc (hoặc số bất kỳ khác được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể) và khuẫn lạc không điển hình hoặc đã được khẳng định có thể nhìn thấy, thì báo cáo kết quả như sau:

- "ít hơn $1/V_2 d_2$ vi sinh vật trên mililit (sản phẩm dạng lỏng); hoặc
- "ít hơn $1/V_2 d_2$ vi sinh vật trên gam" (sản phẩm dạng khác)

Trong đó:

d_2 là hệ số pha loãng tương ứng độ pha loãng d_2 .

V_2 là thể tích chất cấy được sử dụng cho đĩa chứa dung dịch pha loãng thứ hai d_2 , tính bằng mililit (ml).

TCVN 6404:2016

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

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

Biểu thị kết quả là ít hơn 1 000 vi sinh vật trên millilit hoặc trên gam sản phẩm.

10.3.2.5 Phương pháp tính: trường hợp đặc biệt

CHÚ THÍCH 1: Một số ví dụ không tuân thủ các quy tắc trong 10.3.2.2 trong đó đã quy định các giới hạn trên và giới hạn dưới của số đếm khuẩn lạc của dung dịch pha loãng d_2 so với các kết quả của dung dịch pha loãng d_1 . Nếu không thể thực hiện phép phân tích lặp lại, thì có thể tính và biểu thị kết quả theo 10.3.2.2, nhưng độ chênh sẽ kém hơn so với trường hợp chuẩn và cần được nêu trong báo cáo kết quả.

CHÚ THÍCH 2: Tất cả các phần diễn giải và các ví dụ được thực hiện với trường hợp dùng một đĩa Petri cho mỗi độ pha loãng. Xem Phụ lục D đối với trường hợp dùng hai đĩa cho mỗi độ pha loãng.

CHÚ THÍCH 3: Các giới hạn dưới về số đếm khuẩn lạc của dung dịch pha loãng d_2 được lấy từ các ví dụ trong TCVN 9330-2 (ISO 14461-2)^[42].

CHÚ THÍCH 4: Các số về khoảng tin cậy cần phù hợp với số tối đa được quy định cho số đếm khuẩn lạc

10.3.2.5.1 Nếu số khuẩn lạc đếm được (tổng số các khuẩn lạc, khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc giả định) lớn hơn số đếm tối đa (300 hoặc số bất kỳ được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể) đối với đĩa chứa dung dịch pha loãng thứ nhất d_1 , có số đếm khuẩn lạc (tổng số khuẩn lạc, khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc đáp ứng các tiêu chí nhận biết) nhỏ hơn 10 (giới hạn số đếm thấp) đối với đĩa chứa dung dịch pha loãng tiếp theo d_2 thì biểu thị kết quả như sau:

CHÚ THÍCH: Các tình huống nêu trong điều này là các ví dụ.

a) Nếu số khuẩn lạc của đĩa chứa dung dịch pha loãng d_1 nằm trong khoảng quy định [số đếm tối đa có thể đếm được cộng 1, giới hạn trên của khoảng tin cậy đối với số đếm tối đa] (ví dụ: 301 đến 334) (Phụ lục B) và số đếm khuẩn lạc của dung dịch pha loãng d_2 không nhỏ hơn giới hạn dưới quy định trong 10.3.2.2, sử dụng phương pháp tính chung cho các trường hợp chung (xem 10.3.2.2).

VÍ DỤ 1: Việc đếm (khi số đếm tối đa là 300 được thiết lập cho việc đếm khuẩn lạc) cho các kết quả sau đây:

- Ở độ pha loãng thứ nhất giữ lại (10^{-2}): 310 khuẩn lạc (thấp hơn 334, giới hạn trên của khoảng tin cậy là 300);
- Ở độ pha loãng thứ hai giữ lại (10^{-3}): 8 khuẩn lạc. Giới hạn dưới đối với số đếm khuẩn lạc ở độ pha loãng (10^{-3}) là 18 khuẩn lạc, được xác định từ 310 khuẩn lạc của pha loãng (10^{-2}).

Kết quả của số đếm khuẩn lạc này là không thể chấp nhận.

VÍ DỤ 2: Việc đếm (khi số đếm tối đa là 150 được thiết lập cho việc đếm khuẩn lạc) cho các kết quả sau đây:

- Ở độ pha loãng thứ nhất giữ lại (10^{-2}): 160 khuẩn lạc (thấp hơn 174, giới hạn trên của khoảng tin cậy là 150);

- Ở độ pha loãng thứ hai giữ lại (10^{-3}): 8 khuẩn lạc. Giới hạn dưới đối với số đếm khuẩn lạc ở độ pha loãng (10^{-3}) là 7 khuẩn lạc, được xác định từ 160 khuẩn lạc của độ pha loãng 10^{-2} .

Sử dụng phương pháp tính đổi với các trường hợp chung (10.3.2.2) sử dụng các đĩa đổi với hai độ pha loãng được giữ lại.

- b) nếu số lượng khuẩn lạc đổi với đĩa có chứa dung dịch pha loãng d_1 lớn hơn giới hạn trên của khoảng tin cậy cho số đếm tối đa (ví dụ: 334) và số đếm khuẩn lạc của dung dịch pha loãng d_2 không thấp hơn giới hạn quy định trong 10.3.2.2 và được tính từ giới hạn trên của khoảng tin cậy đổi với số đếm tối đa, thì chỉ lấy kết quả số đếm của dung dịch pha loãng d_2 và tính số đếm ước tính (xem 10.3.2.4.1).

VÍ DỤ 1: Việc đếm (khi số đếm tối đa là 300 được thiết lập cho việc đếm khuẩn lạc) cho các kết quả sau đây:

- Ở độ pha loãng thứ nhất giữ lại (10^{-2}): nhiều hơn 334 khuẩn lạc trên đĩa;
- Ở độ pha loãng thứ hai giữ lại (10^{-3}): 9 khuẩn lạc. Giới hạn dưới đối với số đếm khuẩn lạc ở độ pha loãng (10^{-3}) là 20 khuẩn lạc, được xác định từ 334 khuẩn lạc của độ pha loãng 10^{-2} .

Kết quả của việc đếm khuẩn lạc này là không thể chấp nhận được.

VÍ DỤ 2: Việc đếm (khi số đếm tối đa là 150 được thiết lập cho việc đếm khuẩn lạc) cho các kết quả sau đây:

- Ở độ pha loãng thứ nhất giữ lại (10^{-2}): nhiều hơn 174 khuẩn lạc trên đĩa;
- Ở độ pha loãng thứ hai giữ lại (10^{-3}): 9 khuẩn lạc. Giới hạn dưới đối với số đếm khuẩn lạc ở độ pha loãng (10^{-3}) là 8 khuẩn lạc, được xác định từ 174 khuẩn lạc của pha loãng 10^{-2} .

Báo cáo kết quả là số đếm được ước tính các khuẩn lạc đếm được trong đĩa ở độ pha loãng 10^{-3} (xem 10.3.2.4.1).

VÍ DỤ 3: Việc đếm (khi số đếm tối đa là 150 được thiết lập cho việc đếm khuẩn lạc) cho các kết quả sau đây:

- Ở độ pha loãng thứ nhất giữ lại (10^{-2}): nhiều hơn 174 khuẩn lạc trên đĩa;
- Ở độ pha loãng thứ hai giữ lại (10^{-3}): 5 khuẩn lạc. Giới hạn dưới đối với số đếm khuẩn lạc ở độ pha loãng (10^{-3}) là 8 khuẩn lạc, được xác định từ 174 khuẩn lạc của pha loãng 10^{-2} .

Kết quả của việc đếm khuẩn lạc này là không thể chấp nhận được.

10.3.2.5.2 Trường hợp số đếm khuẩn lạc (tổng số khuẩn lạc, khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc giả định) trên một trong các đĩa có tất cả các dung dịch pha loãng đã nuôi cấy, cho số lượng lớn hơn 300 (hoặc số đếm bất kỳ được nêu trong tiêu chuẩn cụ thể), thì báo cáo kết quả như sau:

"nhiều hơn 300/Vd" (trong trường hợp tổng số khuẩn lạc hoặc khuẩn lạc điển hình) hoặc
 "nhiều hơn (300/Vd) x (b/A)" (trong trường hợp các khuẩn lạc được khẳng định), tinh bằng
 số lượng vi sinh vật trên mililit" (sản phẩm dạng lỏng) hoặc vi sinh vật trên miligam (sản
 phẩm dạng khác).

Trong đó:

c là độ pha loãng của dung dịch pha loãng được nuôi cấy cuối cùng;

V là thể tích chất cấy được sử dụng cho mỗi đĩa, tính bằng mililit (ml).

b là số khuỷn lạc đáp ứng được các tiêu chí nhận biết trong số các khuỷn lạc được nuôi cấy A.

10.3.2.5.3 Trường hợp chỉ có đĩa chứa dung dịch pha loãng được nuôi cấy cuối cùng có thể đếm và có chứa ít nhất 10 khuỷn lạc, lên đến và bao gồm 300 (hoặc số đếm bất kỳ được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể) khuỷn lạc (tổng số khuỷn lạc, khuỷn lạc điển hình hoặc khuỷn lạc già định), thì tính số N' vi sinh vật có mặt, sử dụng Công thức (4);

$$N' = \frac{c}{Vd} \quad (4)$$

Trong đó:

c là số khuỷn lạc đếm được trên đĩa;

V là thể tích chất cấy được sử dụng trong mỗi đĩa, tính bằng mililit (ml);

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

Làm tròn kết quả theo quy định trong 10.3.2.2.

Báo cáo kết quả là số lượng N' vi sinh vật trên mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (sản phẩm dạng khác).

VÍ DỤ: Việc đếm cho các kết quả sau:

- Ở độ pha loãng cuối cùng được nuôi cấy (10^{-4}): 120 khuỷn lạc.

Do đó:

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

Làm tròn kết quả theo quy định trong 10.3.2.2, số lượng N' vi sinh vật là 1 200 000, hoặc $1,2 \times 10^6$ trên mililit hoặc trên gam.

10.3.2.6 Độ không đảm bảo đo

Xem TCVN 9332 (ISO/TS 19036:2006, With Amd. 1:2009) đối với các phép định lượng.

10.4 Định lượng nấm men và nấm mốc

10.4.1 Yêu cầu chung

Nấm men và nấm mốc thường được định lượng bằng một kỹ thuật đĩa để dễ dàng định lượng hơn hoặc bằng kỹ thuật cây ria bì mặt để các tế bào có thể tiếp xúc tối đa với oxy trong không khí và tránh bị quá nhiệt từ môi trường thạch nóng chảy. Các đĩa thạch đã rót sẵn cần được làm khô trước khi nuôi cây [xem TCVN 8128 (ISO 11133)].

Một số loại nấm men và nấm mốc có thể bị lây nhiễm hoặc có thể gây dị ứng, ngay cả với người khỏe mạnh. Do đó, cần thận trọng khi xử lý chúng. Tốt nhất, đĩa được giữ trong tủ âm, không để trong phòng mở. Chỉ mở nắp đĩa khi cần, ví dụ: để chuẩn bị phiến kính để kiểm tra dưới kính hiển vi. Kim cây phải để ngoài trước khi thực hiện việc cây truyền, để tránh phát tán các bào tử và các tế bào khác. Bàn làm việc và tủ âm phải được khử trùng thường xuyên.

Các đĩa Petri cần được để trong ủ âm theo hướng thẳng đứng và không bị xáo trộn cho đến khi đêm, vì nếu di chuyển làm giải phóng các bào tử nấm mốc hoặc bào tử và dẫn đến phát triển tiếp các khuẩn lạc vệ tinh làm cho số đêm bị tăng cao.

10.4.2 Đếm các khuẩn lạc nấm men và nấm mốc

Đếm các đĩa chứa từ 10 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc. Nếu hệ nấm gồm chủ yếu là các nấm mốc, thì chọn các đĩa có vùng phát triển thấp hơn; nếu hệ nấm gồm chủ yếu là các nấm men, thì chọn các đĩa có số đêm lên đến giới hạn trên để đếm.

Nếu việc nhận biết các khuẩn lạc còn có sự nghi ngờ, thì kiểm tra bằng cách soi tươi hoặc nhuộm màu tế bào từ ít nhất năm khuẩn lạc trên mỗi mẫu để khẳng định sự không có mặt của vi khuẩn.

10.5 Phương pháp định lượng sử dụng một môi trường lỏng

10.5.1 Nguyên tắc

Các phần mẫu thử được cấy vào môi trường lỏng được thiết kế để hỗ trợ sự tăng trưởng của một vi sinh vật cụ thể hoặc một nhóm vi sinh vật và thường ức chế sự tăng sinh của các vi sinh vật không phải đích.

Để xác định sự phát triển của các vi sinh vật đích, có thể sử dụng tiêu chí khác nhau, ví dụ: quan sát độ đặc, sinh khí, thay đổi màu sắc, phân lập tiếp của các vi sinh vật trên môi trường thạch chọn lọc khi ủ có kiểm soát môi trường và nhiệt độ. Thành phần của môi trường phát triển và tiêu chí để phân biệt giữa kết quả dương tính và kết quả âm tính được xác định trong các tiêu chuẩn tương ứng.

Sử dụng phương pháp này, chỉ đánh giá định tính đối với từng phần thử, nghĩa là kết quả âm tính hay dương tính. Để thu được số ước tính về lượng vi sinh vật có mặt thì cần kiểm tra một số phần mẫu

thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng, sử dụng các quy trình thống kê để xác định số có xác xuất lớn nhất (MPN).

10.5.2 Nuôi cấy

10.5.2.1 Yêu cầu chung

Nếu sử dụng môi trường phát triển có chọn lọc, thi việc bổ sung phần mẫu thử không làm giảm đặc tính chọn lọc của môi trường, do đó cho phép phát triển các vi sinh vật không phải đích. Trong hầu hết các tiêu chuẩn, thông tin về sự phù hợp của nền mẫu cụ thể và môi trường lỏng được nêu trong phạm vi áp dụng, nhưng cần thận trọng với các nền mẫu như gia vị, ca cao, nước dùng, v.v... vì chúng có thể chứa các chất ức chế tăng trưởng, cần phải bổ sung các hợp chất trung hòa, cần sử dụng các hệ số pha loãng cao hơn, ly tâm, lọc, phân tách miễn dịch để tách các vi sinh vật đích ra khỏi nền mẫu, mặc dù điều này không phải lúc nào cũng được xác định cụ thể trong các tiêu chuẩn tương ứng. Tính không tương thích cũng có thể là do các thành phần sinh học của nền mẫu: các mẫu môi trường bị ô nhiễm nặng, các sản phẩm lên men, sản phẩm có vi khuẩn probiotic cho thấy nhiều thách thức lớn hơn đối với người phân tích so với các mẫu chỉ chứa rất ít vi sinh vật. Đối với các nền mẫu có vấn đề, sử dụng các thực nghiệm trên nền mẫu bổ sung các sinh vật thử nghiệm đại diện để xác minh rằng phương pháp này thực sự phù hợp với nền mẫu đó.

Nếu sử dụng phương pháp MPN để phân tích các mẫu đặc (kể cả dạng bột), thi chỉ lấy một phần mẫu thử để chuẩn bị huyền phù ban đầu. Từ huyền phù ban đầu này, sử dụng các lượng nhỏ để kiểm tra.

10.5.2.2 Cách tiến hành

Lấy một phần mẫu thử nhỏ hơn hoặc bằng 1 ml cho vào môi trường nồng độ đơn với lượng gấp 5 đến 10 lần thể tích mẫu, trừ khi có qui định khác trong các tiêu chuẩn tương ứng. Thường lấy từ 1 ml đến 100 ml các phần mẫu thử cho vào các thể thích tương đương của môi trường nồng độ kép.

Với các thể tích lớn hơn 100 ml, thi có thể sử dụng môi trường nuôi cấy đậm đặc hơn. Đối với các mục đích đặc biệt, có thể hòa tan môi trường nuôi cấy khô trong mẫu để lạnh (hoặc được làm ấm trước đến 30 °C) để phân tích.

Thời gian từ khi chuẩn bị huyền phù ban đầu của mẫu đến khi nuôi cấy ống nghiệm cuối cùng, các đĩa vi giếng hoặc các lọ cần ít hơn 30 min, trừ khi có quy định khác.

10.5.3 Lựa chọn hệ thống nuôi cấy

Bản chất của phương pháp MPN là pha loãng mẫu thử đến mức mà có thể chắt cấy có thể không chứa các vi sinh vật đích quan sát được. Các "kết quả", nghĩa là số lượng chắt cấy có phát triển ở mỗi độ pha loãng, sẽ cung cấp số ước tính về nồng độ ban đầu của vi khuẩn trong mẫu. Để thu được số ước tính trên dải rộng của nồng độ có thể, thi người phân tích cần sử dụng một dãy các dung dịch pha

loãng, ủ ấm một vài ống (hoặc vài đĩa v.v...) ở mỗi độ pha loãng. MPN vi sinh vật có mặt trong mẫu ban đầu và độ chụm của việc ước tính, có thể được tính bằng các quy trình thống kê theo số ống nghiệm dương tính và âm tính quan sát được sau khi ủ.

Chọn từ các cấu hình MPN khác nhau có sẵn theo:

- số lượng dự kiến của các vi sinh vật trong mẫu kiểm tra;
- các yêu cầu luật định;
- độ chụm cần có; và
- mọi xem xét thực tế khác.

Độ không đảm bảo do phụ thuộc vào số lượng các phần mẫu thử dương tính quan sát được theo cách tương tự vì độ không đảm bảo do về số đếm khuẩn lạc phụ thuộc vào số khuẩn lạc có trên đĩa. Độ không đảm bảo do thay đổi theo hàm số căn bậc hai của số ống nghiệm được sử dụng, vì độ chụm tăng theo số lượng phép thử lặp lại; nhưng cần tăng bốn lần số ống nghiệm để giảm một nửa độ không đảm bảo do. Khi các hệ thống chỉ có một vài ống nghiệm lặp lại, thì độ không đảm bảo do tương đối sẽ cao.

Tùy thuộc cỡ ống, mà có thể nuôi cấy các phần mẫu thử vào các ống hoặc lọ chứa một lượng cần thiết môi trường lỏng. Đối với các phần mẫu thử nhỏ, có thể sử dụng đĩa vi giếng.

10.5.3.1 Hệ thống một độ pha loãng

Khi nồng độ dự kiến các vi sinh vật là nhỏ hoặc dự kiến sẽ thay đổi chỉ vừa phải, thì hệ thống cấy thích hợp nhất là một dãy các phần mẫu thử bằng nhau. Khi tỷ lệ dự kiến giữa số lượng vi sinh vật tối đa và tối thiểu nhỏ hơn khoảng 25, thì ít nhất là 10 phần mẫu thử sẽ cung cấp thông tin hữu ích; với 50 ống song song, tỷ lệ giới hạn là 200. Nếu nồng độ thực tế là rất gần với các giá trị MPN có thể, thì cơ hội đối với tất cả các ống có phát triển hoặc các ống không có phát triển có khả năng rất cao. Các ví dụ về các số MPN ở một độ pha loãng MPN được đưa ra trong các Bảng từ C.1 đến C.4.

10.5.3.2 Hệ thống nhiều độ pha loãng

Khi nồng độ vi sinh vật trong mẫu là chưa biết hoặc dự đoán có nhiều dao động, thì có thể cần phải nuôi cấy một dãy các ống từ một số độ pha loãng. Nuôi cấy đủ một lượng các dung dịch pha loãng để đảm bảo hệ thống có cả kết quả dương tính và âm tính. Số lượng các dung dịch pha loãng được sử dụng phụ thuộc vào phương pháp tính được sử dụng để ước lượng giá trị MPN. Nếu sử dụng các bảng MPN khi đó cấu hình hệ thống được giới hạn đến các giá trị có sẵn trong các bảng. Với chương trình máy tính, số dung dịch pha loãng và số ống song song không bị giới hạn, mà điều này quan trọng trong việc sử dụng các bộ kit thử MPN mới có bán sẵn.

10.5.3.3 Hệ thống pha loãng đối xứng

Hệ thống MPN đối xứng thường được sử dụng nhiều nhất dùng ba hoặc năm ống song song cho mỗi độ pha loãng. Độ chụm thu được với các hệ thống này sử dụng một lượng nhỏ các ống cho mỗi độ pha loãng là rất thấp. Các kết quả của hệ thống thiết kế ba ống là khó hơn về chỉ số thứ tự của nồng độ. Nếu yêu cầu độ chụm cao hơn, thì nên sử dụng hệ thống năm hoặc nhiều hơn năm ống song song. Các ví dụ về MPN ba ống, MPN năm ống và MPN 10 ống được đưa ra trong các Bảng C.5, C.6 và C.7 tương ứng.

10.5.3.4 Hệ thống pha loãng không đối xứng

Các hệ thống không đối xứng có các số ống khác nhau ở các mức độ pha loãng khác nhau và chỉ nên sử dụng để ước tính số lượng vi sinh vật trong mẫu được xác định trước (xem ví dụ trong TCVN 9716 (ISO 8199)). Thỉnh thoảng có thể bị mất một ống hoặc bị hỏng dẫn đến hệ thống không đối xứng. Tuy nhiên, trên thị trường vẫn có một số bộ kit thử dựa trên các hệ thống không đối xứng. Do đó, các dữ liệu thu được từ hệ thống này nên được đánh giá bằng cách sử dụng một chương trình phần mềm máy tính thích hợp (xem 10.5.6.3).

10.5.4 Ủ ám

Ủ các ống, lọ hoặc các chai đã cấy trong tủ ấm hoặc trong nồi cách thủy. Đặt các đĩa vi giếng trong tủ ấm.

Chọn thời gian và nhiệt độ ủ sau khi tham chiếu đến phương pháp chuẩn cụ thể, vì chúng phụ thuộc vào các vi sinh vật hoặc nhóm vi sinh vật cần tìm.

Đối với một số vi sinh vật, có thể cần đến quy trình ủ gồm hai bước và/hoặc bước khẳng định. Xem chi tiết trong các tiêu chuẩn cụ thể, nhưng cần lưu ý rằng có thể khó để có được các giá trị MPN (xem Tài liệu tham khảo [52]).

10.5.5 Diễn giải kết quả

Các tiêu chí phân biệt các kết quả dương tính với các kết quả âm tính thay đổi đối với từng loại vi sinh vật hoặc nhóm vi sinh vật và được xác định trong các tiêu chuẩn tương ứng. Sử dụng các tiêu chí này để điểm và ghi lại số kết quả dương tính với tất cả các phần mẫu thử của một mẫu.

10.5.6 Xác định các giá trị MPN

Có ba khả năng khác nhau để xác định giá trị MPN: tính bằng các công thức toán học, đối chiếu với các bảng MPN, hoặc sử dụng các chương trình máy tính cụ thể. Với điều kiện là chúng được dựa trên những yếu tố thống kê như nhau và chúng có hiệu lực như nhau. Ba phương pháp này như sau:

10.5.6.1 Công thức toán học

10.5.6.1.1 Công thức gần đúng cho mọi trường hợp

Giá trị MPN gần đúng (M) đối với bất kỳ số của các dung dịch pha loãng và các ống song song có thể thu được sử dụng Công thức (5):

$$M / g = \frac{Z_p}{\sqrt{m_s m_t}} \quad (5)$$

Trong đó:

Z_p là số ống dương tính;

m_s là tổng khối lượng mẫu trong tất cả các ống có phản ứng âm tính, tính bằng gam (g);

m_t là tổng khối lượng của mẫu trong tất cả các ống, tính bằng gam (g).

Ví dụ: (từ Tài liệu tham khảo [53]):

Giả sử phép thử được thực hiện trên 10 phần mẫu thử, mỗi phần 0,1 g, 0,01 g và 0,001 g và tìm thấy 10, 4 và 2 kết quả dương tính, đối với các đáp số phân đoạn (tức là 4 và 2) thì tổng số kết quả dương tính là $Z_p = 6$. Tổng khối lượng được thử nghiệm là $m_t = 10 \times 0,01 + 10 \times 0,001 = 0,11$ g và tổng khối lượng trong các ống âm tính $m_s = 6 \times 0,01 + 8 \times 0,001 = 0,068$

$$M / g = \frac{6}{\sqrt{0,068 \times 0,11}} = \frac{6}{\sqrt{0,0075}} = \frac{6}{0,0865} = 69,4$$

Kết quả tương đồng với giá trị trong Bảng đối với 10 – 4 – 2, vậy MPN bằng 70 trên gam.

10.5.6.1.2 Độ pha loãng “chính xác” đối với một dãy các ống

Giá trị MPN (M) đối với một dãy các ống riêng lẻ thu được từ Công thức (6):

$$M / g = -\frac{1}{m} \ln \left[\frac{S}{N} \right] \quad (6)$$

Trong đó:

m là khối lượng của mẫu trong mỗi ống của dãy, tính bằng gam (g);

\ln là logarit tự nhiên;

N là số ống trong dãy;

S là số ống có phản ứng âm tính.

10.5.6.1.3 Độ chụm ước tính đối với các phép phân tích cho một độ pha loãng

Các giới hạn tin cậy 95 % của ước tính MPN có thể được tính gần đúng từ MPN thu được và độ lệch chuẩn của $\log_{10}M$ sử dụng quy trình trong Tài liệu tham khảo [55], như được mô tả trong Tài liệu tham khảo [53], xem thêm [52]:

CHÚ THÍCH: Theo TCVN 7870-2: 2010 (ISO 80000-2:2009)^[57], Điều 12, biểu tượng logarit thập phân là "lg". Tuy nhiên, trong tiêu chuẩn này biểu tượng "log10" thường được sử dụng rộng rãi trong các phòng thử nghiệm vi sinh vật thực phẩm.

Sai số chuẩn của MPN ($s_{\log_{10}M}$) được tính bằng cách sử dụng Công thức (7):

$$\widehat{s_{\log_{10}M}} = \frac{1 - \exp(-Mm)}{2,303 \times Mm \sqrt{G \exp(-Mm)}} \quad (7)$$

Trong đó:

M là MPN;

m là khối lượng chất cấy trên ống;

G là số ống cho thấy có sự phát triển và $e =$ hệ số mũ.

Số xấp xỉ chuẩn đối với các giới hạn tin cậy được cho là $M \pm 1,96 \times \widehat{s_{\log_{10}M}}$

Ví dụ:

Giả sử rằng 0,1 g mẫu (m) được nuôi cấy vào ống $n = 20$ và có $G = 4$ kết quả dương tính (do đó có 16 kết quả âm tính). Giá trị MPN (M) trên mỗi gram được tính như sau:

$$M = -\frac{1}{m} \ln\left(\frac{S}{N}\right) = -\frac{1}{0,1} \times \ln\left(\frac{16}{20}\right) = -10 \times \ln(0,8) = 2,23$$

Và sai số chuẩn $\widehat{s_{\log_{10}M}}$ bằng:

$$\widehat{s_{\log_{10}M}} = \frac{1 - \exp(-Mm)}{2,303 \times Mm \sqrt{G \exp(-Mm)}} = \frac{1 - \exp(-0,223)}{2,303 \times 0,223 \sqrt{4 \exp(-0,223)}} = \frac{(1-0,80)}{0,5136 \times \sqrt{3,2}} = \frac{0,20}{0,9187} = 0,22$$

Ta có, $\widehat{s_{\log_{10}M}} = 0,35$ và số gần đúng tiêu chuẩn với các giới hạn tin cậy được cho là $M \pm 1,96 \times \widehat{s_{\log_{10}M}}$

Giới hạn dưới của $\widehat{s_{\log_{10}M}}$ là $0,35 - (1,96 \times 0,22) = 0,35 - 0,43 = -0,08$.

Giới hạn trên của $\widehat{s_{\log_{10}M}}$ là $0,35 + 0,43 = 0,78$.

Vì vậy, giới hạn dưới của M là $\text{antilog}_{10}(-0,08) = 0,82$ và giới hạn trên của M là $\text{antilog}_{10}(0,78) = 6,1$

Tuy nhiên, không phải thực hiện tính bằng thủ công mà có thể xác định bằng cách sử dụng máy tính MPN (10.5.6.3).

10.5.6.1.4 Độ chụm ước tính cho các phép phân tích nhiều độ pha loãng đối xứng

Lôgarit thập phân của độ lệch chuẩn của hệ thống MPN nhiều độ pha loãng đối xứng có thể thu được từ Công thức gần đúng Cochran (8) (Tài liệu tham khảo [28]):

$$s = 0,58 \sqrt{\frac{\log_{10} f}{N}} \quad (8)$$

Trong đó:

- s là độ lệch chuẩn của lôgarit thập phân của MPN;
- f là hệ số pha loãng giữa các độ pha loãng liên tiếp (thường là 10);
- N là số ống cho mỗi độ pha loãng.

Các giới hạn tin cậy trên và dưới 95 % có thể tính được gần đúng, bằng cách nhân và chia số ước tính MPN cho số đổi logarit của $2s$. Quy trình này có xu hướng làm tăng giới hạn tin cậy trên. Có thể thu được số ước tính chính xác hơn khi sử dụng máy tính MPN (10.5.6.3).

10.5.6.2 Bảng MPN

10.5.6.2.1 Các bảng dùng cho các hệ thống một độ pha loãng

Các Bảng C.1 đến C.4 cung cấp các giá trị MPN và các giới hạn tin cậy 95 % cho phần mẫu thử có 10, 15, 20 và 25 ống song song (giả sử mỗi ống được lấy cùng một thể tích của một dung dịch pha loãng).

Để thể hiện kết quả trên lượng mẫu đối chứng (hoặc trên thể tích mẫu dạng lỏng), thì nhân MPN và các giá trị giới hạn 95 % theo tỷ lệ khối lượng tham chiếu với khối lượng phần mẫu thử. Không nhân độ không đảm bảo tiêu chuẩn logarit. Khối lượng đối chứng trong phân tích vi sinh thực phẩm thường là 1 g. Khối lượng phần mẫu thử tương ứng với lượng mẫu (tính bằng gam) có trong thể tích được dùng để lấy các ống, ví dụ: 0,1 g nếu sử dụng 1 ml của huyền phù mẫu 10^{-1} .

VÍ DỤ: (Tài liệu tham khảo [30])

Tổng số 20 ống canh thang nồng độ kép đã được lấy với các lượng 5 ml mẫu pha loãng 10 lần (0,1 g/ml). Sau khi ủ, 16 ống cho thấy có sự phát triển. Thể tích MPN của vi khuẩn (số sinh vật trên mỗi gam) có trong mẫu là bao nhiêu?

Trên Bảng B.3 cho thấy 1,61 MPN của vi sinh vật trong mỗi ống, nằm trong giới hạn dưới và giới hạn trên của mức tin cậy 95 % tương ứng là 0,93 và 2,77.

Mỗi ống nhận được một phần mẫu thử 5 ml, tương ứng với 0,5 g mẫu. Vì vậy, MPN của vi sinh vật (M) trong 1 g mẫu thử được tính như sau:

$$M = \frac{1,61}{0,5} / g = 3,22 / g$$

với các giới hạn tin cậy 95 % dao động trong dải, đổi với giới hạn dưới 2,5 %:

$$\frac{0,93}{0,5} / g = 1,9 / g$$

Đổi với giới hạn trên 87,5 %:

$$\frac{2,77}{0,5} / g = 5,5 / g$$

10.5.6.2.2 Các Bảng dùng cho hệ thống nhiều độ pha loãng: ba độ pha loãng liên tiếp

Với hệ thống đối xứng, thường sử dụng ba độ pha loãng liên tiếp với ba lần lặp lại (Bảng C.5), năm lần lặp lại (Bảng C.6) hoặc 10 lần lặp lại (Bảng C.7). Ghi số kết quả dương tính đổi với mỗi bộ ống và từ bảng MPN đổi với hệ thống nuôi cấy được sử dụng, đọc số MPN của vi sinh vật có mặt trong thể tích đối chứng của mẫu.

Các bảng sửa đổi này cung cấp các lôgarit thập phân của MPN, độ lệch chuẩn $s_{\log 10 M}$, các giới hạn tin cậy trên và dưới giới hạn tin cậy dưới của khoảng tin cậy 95 % cùng với "giá trị hiếm và phạm trù hiếm". "Giá trị hiếm" (dựa trên nghiên cứu của Blodgett trong các Tài liệu tham khảo [52] đến [54]) cung cấp phương pháp đơn giản hơn để đánh giá khả năng về kết quả thu được trong phép thử.

Một số tổ hợp của các ống dương tính có nhiều khả năng xảy ra hơn so với trường hợp khác; Ví dụ, tổ hợp các kết quả dương tính 0 – 0 – 3 ít có khả năng xảy ra hơn so với tổ hợp 3 – 2 – 1. Để định lượng khả năng này, các chỉ số hiếm đã tính được theo tỷ lệ của hai giá trị có khả năng xảy ra:

$$r = \frac{L(\hat{\mu})}{L_0(\hat{\mu})}$$

Trong đó:

$L(\hat{\mu})$ là khả năng của các kết quả quan sát được, $x_1, x_2 \dots x_k$ của phép thử dãy dung dịch pha loãng;

$L_0(\hat{\mu})$ là khả năng nếu kết quả là có khả năng nhất dưới nồng độ μ bằng mức dự đoán $\hat{\mu}$ của nồng độ μ .

Chi tiết đầy đủ của quy trình tính toán các khả năng được đưa ra trong Tài liệu tham khảo [56].

Chỉ số hiếm là một giá trị giữa 0 và 1. Bằng 1 nếu kết quả của phép thử dãy dung dịch pha loãng có thể có nồng độ bằng MPN được ước tính. Nếu gần bằng 0 kết quả của phép thử của dung dịch pha loãng rất khó xảy ra đối với một nồng độ bằng với MPN ước tính. Theo cách tiếp cận trong Tài liệu tham khảo [27], đã sử dụng ba phạm trù hiếm:

Phạm trù 1: giá trị MPN sẽ rất dễ xảy ra nếu giá trị hiếm nằm trong dải từ 0,05 đến 1,00, $0,05 \leq n \leq 1,00$; nghĩa là kết quả sẽ có khả năng xảy ra tinh cờ trên 95 % các trường hợp.

Phạm trù 2: giá trị MPN được dự kiến hiếm khi xảy ra, nếu giá trị hiếm nằm trong dải từ 0,01 đến 0,05, $0,01 \leq n \leq 0,05$; kết quả như vậy sẽ có khả năng xảy ra tinh cờ với tần số nhỏ hơn 5 %.

Phạm trù 3: giá trị MPN được dự kiến rất hiếm khi xảy ra, nếu giá trị hiếm nằm trong dải từ 0 đến 0,01, $0 \leq n \leq 0,01$; nghĩa là kết quả như vậy được dự kiến sẽ xảy ra một cơ hội ít hơn một lần trong 100 phép thử.

Các bảng cho thấy chỉ có các tổ hợp của các kết quả nằm trong các loại 1 và 2

Trong mọi tình huống khi có trên ba độ pha loãng được thực hiện, thì cần sử dụng tất cả các giá trị dữ liệu đo được. Không cần chính xác để "chọn" bất kỳ giá trị tổ hợp nào trên giả thuyết các giá trị này là "chính xác" hơn so với các tổ hợp khác. Các kết quả từ tất cả các tổ hợp của các ống dương tính cần được ghi lại và sử dụng máy tính MPN (10.5.6.3) để thu được giá trị MPN.

10.5.6.3 Chương trình máy tính

Các chương trình được sử dụng để xác định giá trị MPN yêu cầu để nhận biết các tổ hợp ống không thể xảy ra mà có thể phản ánh có vấn đề khi thực hiện phép thử vi sinh vật (xem 10.5.6.2.2 liên quan đến các tổ hợp ống không xảy ra và sử dụng các bảng MPN). Một số chương trình máy tính có sẵn để ước tính các giá trị MPN sử dụng Excel® (xem Chú thích) định dạng bảng tính, nhưng nhiều chương trình không có khả năng đánh giá khi các tổ hợp ống không nhập vào chương trình và các phương pháp khác nhau đã được sử dụng để ước tính giới hạn tin cậy.

Hiện có chương trình phần mềm mới sử dụng trong Excel® (xem chú thích) đã được viết mà có thể xử lý đến 10 mức của dãy pha loãng. Chương trình đã được sử dụng để ước tính MPN và các thông số của nó như trong các bảng đã sửa đổi C.5, C.6. và C.7. Khuyến khích rằng chương trình này được sử dụng tốt hơn so với các chương trình khác, vì các kết quả đối với tổ hợp bất kỳ của kết quả thu được với 3 độ pha loãng sẽ giống như kết quả trong các bảng công bố. Chi tiết về các phép tính được nêu trong Tài liệu tham khảo [55] và các phần mềm có sẵn có thể được tải về từ nguồn: <http://standards.iso.org/iso/7218/>

Nếu bảng tính Excel® tô đậm tổ hợp ống là không thể xảy ra, thì không báo cáo về giá trị MPN.

CHÚ THÍCH: Excel là tên thương mại của sản phẩm được Microsoft cung cấp. Thông tin này được đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ẩn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

11 Phương pháp phát hiện (phương pháp định tính)

11.1 Yêu cầu chung

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

11.2 Nguyên tắc

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

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

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

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

Việc chọn các khuẩn lạc để khẳng định cần bao trùm các loại khuẩn lạc đại diện nghỉ ngơi.

11.3 Đo độ không đảm bảo

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

12 Phương pháp khẳng định

12.1 Yêu cầu chung

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

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

12.2 Chuẩn bị chủng cây thuần khiết

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

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

12.3 Nhuộm Gram (kỹ thuật Hucker cải biến)

12.3.1 Yêu cầu chung

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

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

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

12.3.2 Dung dịch

12.3.2.1 Yêu cầu chung

Có thể dùng các dung dịch bán sẵn.

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

12.3.2.2 Dung dịch tím tinh thể

12.3.2.2.1 Thành phần

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

12.3.2.2 Chuẩn bị

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

12.3.2.3 Dung dịch iốt

12.3.2.3.1 Thành phần

Iốt: 1,0 g

Kali iodua (KI): 2,0 g

Nước: 100 ml

12.3.2.3.2 Chuẩn bị

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

12.3.2.4 Dung dịch safranin

12.3.2.4.1 Thành phần

Safranin: 0,25 g

Etanol (95 %): 10 ml

Nước: 100 ml

12.3.2.4.2 Chuẩn bị

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

12.3.3 Kỹ thuật nhuộm

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

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

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

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

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

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

Làm khô lam kính.

12.3.4 Diện giải kết quả

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

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

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

12.4 Sử dụng bộ thử sinh hoá để nhận biết

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

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

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

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

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

12.5 Sử dụng các đầu dò nucleic

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

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

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

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

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

12.6 Phương pháp huyết thanh

12.6.1 Yêu cầu chung

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

12.6.2 Các phép thử ngưng kết trên lam kính

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

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

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

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

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

12.6.3 Phép thử ngưng kết latex

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

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

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

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

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

13 Báo cáo thử nghiệm

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

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

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

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

14 Xác nhận tính hiệu lực của các phương pháp

14.1 Xác nhận tính hiệu lực của các phương pháp chuẩn

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

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

Xem ISO 16140-2 về quy trình kỹ thuật để xác nhận tính hiệu lực của các phương pháp thay thế theo phương pháp chuẩn.

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

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

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

15.1 Kiểm soát chất lượng nội bộ

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

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

Chương trình có thể bao gồm:

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

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

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

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

15.2 Các chủng chuẩn

Xem TCVN 8128 (ISO 11133) về việc duy trì các chủng chuẩn.

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

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

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

Phụ lục A

(Tham khảo)

Tính chất của một số chất tẩy rửa

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

Chất tẩy rửa	Tác động chống lại							Khử hoạt tính					Độc tính		
	Nấm	Vì khuẩn		Bảo tử	Virut lipid	Vì rết không lipid	Protein	Chất tự nhiên	Chất tổng hợp	Nuôi cung	Chất tẩy rửa	Da	Mắt	Phổi	
		Gram dương	Gram âm												
Hypoclorit	+	+++	+++	++	++	+	+	+++	+	+	+	C	+	+	+
Rượu	-	+++	+++	+++	-	+	V	+	+	+	+	-	-	-	+
Formaldehyt	+++	+++	+++	+++	+++ ^a	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Glutaraldehyt	+++	+++	+++	+++	+++ ^b	+	+	NA	+	+	+	NA	+++	+++	+++
Iodophor	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+	+	+	A	+	+	-

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

Nguồn gốc: Tham khảo [17].

Phụ lục B

(Tham khảo)

Khoảng tin cậy cho kỹ thuật đếm khuẩn lạc**B.1 Khoảng tin cậy cho kỹ thuật đếm khuẩn lạc**

Để đánh giá hiệu lực của các kết quả và để tránh diễn giải quá nghiêm ngặt, cần ước tính độ không đảm bảo đo, nếu không có sẵn, để ước tính khoảng tin cậy đặc trưng cho phân bố thống kê của vi sinh vật trong mẫu.

Khi giá trị của độ không đảm bảo đo là không có sẵn, thi khoảng tin cậy δ đặc trưng cho sự phân tán của vi sinh vật, có thể được tính sử dụng Công thức (B.1) (với xác suất 95 %).

$$\delta = \left[\frac{\sum C}{B} \pm \frac{\sqrt{1.96 \sum C}}{B} \right] \frac{1}{d} \quad (\text{B.1})$$

Trong đó:

$$B = V(n_1 + 0,1 n_2)$$

Trong đó:

V là thể tích dịch cấy có trong mỗi đĩa, tính bằng millilit (ml);

n_1 là số đĩa ở độ pha loãng thứ nhất được giữ lại;

n_2 là số đĩa ở độ pha loãng thứ hai được giữ lại;

ΣC là tổng các khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại từ hai độ pha loãng liên tiếp;

d là dung dịch pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất được giữ lại.

ví dụ 1:

Việc định lượng cho các kết quả (hệ thống một đĩa cho mỗi độ pha loãng) sau đây:

- ở độ pha loãng thứ nhất giữ lại (10^{-2}): 215 khuẩn lạc;
- ở độ pha loãng thứ hai giữ lại (10^{-3}): 14 khuẩn lạc.

$$N = \frac{\sum C}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d} = \frac{215 + 14}{1 \times [1 + (0,1 \times 1)] \times 10^{-2}} = \frac{229}{0,011} = 20818$$

Làm tròn kết quả theo quy định ở trên, số vi sinh vật đếm được là 21 000 hoặc $2,1 \times 10^4$ trên millilit hoặc trên gam sản phẩm.

Với $N = 2,1 \times 10^4$ trên gam, thì đổi với 229 khuẩn lạc đếm được, giới hạn tin cậy δ là:

$$\delta = \left[\frac{229}{1,1} \pm \frac{\sqrt[100]{229}}{1,1} \right] \times \frac{1}{10^{-2}}$$

$$\delta = (208,18 \pm 26,96) \times 10^2$$

Do đó, các giới hạn tin cậy là: $\delta_1 = 1,8 \times 10^4$ và $\delta_2 = 2,4 \times 10^4$.

VÍ DỤ 2:

Việc định lượng cho các kết quả (hệ thống hai đĩa cho mỗi độ pha loãng) sau đây:

- Ở độ pha loãng thứ nhất giữ lại (10^{-2}): 168 khuẩn lạc và 215 khuẩn lạc;
- Ở độ pha loãng thứ hai giữ lại (10^{-3}): 14 khuẩn lạc và 25 khuẩn lạc.

$$N = \frac{\sum C}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1 \times [2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19182$$

Làm tròn kết quả theo quy định ở trên, số vi sinh vật đếm được là 19 000 hoặc $1,9 \times 10^4$ trên millilit hoặc trên gam sản phẩm.

Với $N = 1,9 \times 10^4$ trên gam, thì đổi với 422 khuẩn lạc đếm được, giới hạn tin cậy δ là:

$$\delta = \left[\frac{422}{2,2} \pm \frac{\sqrt[100]{422}}{2,2} \right] \times \frac{1}{10^{-2}}$$

$$\delta = (191,82 \pm 18,30) \times 10^2$$

Do đó, các giới hạn tin cậy là: $\delta_1 = 1,7 \times 10^4$ và $\delta_2 = 2,1 \times 10^4$.

Bảng B.1 cho các trung bình khối lượng và khoảng tin cậy δ đổi với số lượng khuẩn lạc có liên quan.

Bảng B.1 – Giá trị trung bình khối lượng và khoảng tin cậy δ đối với số lượng khuẩn lạc có liên quan

Giá trị trung bình khối lượng của số khuẩn lạc đếm được trên hai độ pha loãng liền tiếp	Hệ thống "1 đĩa cho một độ pha loãng"	Hệ thống "2 đĩa cho một độ pha loãng"
Khoảng tin cậy δ	Khoảng tin cậy δ	Khoảng tin cậy δ
300	268 đến 332	277 đến 323
150	127 đến 173	134 đến 166
100	81 đến 119	87 đến 113
30	20 đến 40	23 đến 37
15	7 đến 22	10 đến 20
10	4 đến 16	6 đến 14
7	Không áp dụng	3 đến 10

B.2 Các trường hợp đặc biệt với số đếm thấp

Khoảng tin cậy được nêu trong các Bảng B.2 đến Bảng B.5.

Bảng B.2 – Khoảng tin cậy đối với việc định lượng với hệ thống "một đĩa cho mỗi độ pha loãng", trường hợp số đếm thấp trên một đĩa đơn

Số đếm khuẩn lạc ^a	Giới hạn tin cậy ở mức tin cậy xấp xỉ 95 % ^b		Phần trăm giới hạn tin cậy
	Giới hạn dưới	Giới hạn trên	
1	<1	3	± 196
2	<1	5	± 139
3	<1	6	± 113
4	<1	8	± 98
5	<1	9	± 88
6	1	11	± 80
7	2	12	± 74
8	2	14	± 69
9	3	15	± 65
10	4	16	± 62
11	4	18	± 59
12	5	19	± 57
13	6	20	± 54
14	7	21	± 52
15	7	23	± 51

^a Số khuẩn lạc đếm được trên một đĩa ở một độ pha loãng.

^b Được so sánh với số lượng vi sinh vật tính được và giả sử rằng số đếm được thực hiện trên một đĩa ở một độ pha loãng.

Bảng B.3 – Khoảng tin cậy đối với việc định lượng với hệ thống “một đĩa cho một độ pha loãng”, trường hợp số đếm thấp trên hai đĩa đơn ở hai độ pha loãng

Số đếm khuân lạc ^a	Số đếm vi sinh vật ^b	Giới hạn tin cậy ở mức tin cậy xấp xỉ 95 % ^c		Phần trăm giới hạn tin cậy
		Giới hạn dưới	Giới hạn trên	
1	NA ^d	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA
3	NA	NA	NA	NA
4	NA	NA	NA	NA
5	NA	NA	NA	NA
6	NA	NA	NA	NA
7	NA	NA	NA	NA
8	NA	NA	NA	NA
9	NA	NA	NA	NA
10	9	3	15	± 62
11	10	4	16	± 59
12	11	5	17	± 57
13	12	5	18	± 54
14	13	6	19	± 52
15	14	7	21	± 51

^a là số khuân lạc đếm được trên một đĩa Petri ở hai độ pha loãng liên tiếp.

^b là số đếm trung bình từ hai đĩa Petri;

^c được so sánh với số lượng vi sinh vật tính được và giả sử rằng số đếm được thực hiện trên một đĩa với hai độ pha loãng;

^d Không có kết quả: không tính được số đếm trung bình.

Bảng B.4 – Khoảng tin cậy đối với việc định lượng với hệ thống “hai đĩa cho một độ pha loãng”,
trường hợp trên hai đĩa ở một độ pha loãng cho số đếm thấp

Số đếm khuôn lạc ^a	Số đếm vi sinh vật ^b	Giới hạn tin cậy ở mức tin cậy xấp xỉ 95 % ^c		Phản trream giới hạn tin cậy
		Giới hạn dưới	Giới hạn trên	
1	1	<1	1	± 196
2	1	<1	2	± 139
3	2	<1	3	± 113
4	2	<1	4	± 98
5	3	<1	5	± 88
6	3	<1	5	± 80
7	4	<1	6	± 74
8	4	1	7	± 69
9	5	2	7	± 65
10	5	2	8	± 62
11	6	2	9	± 59
12	6	3	9	± 57
13	7	3	10	± 54
14	7	3	11	± 52
15	8	4	11	± 51
16	8	4	12	± 49
17	9	4	13	± 48
18	9	5	13	± 46
19	10	5	14	± 45
20	10	6	14	± 44
21	11	6	15	± 43
22	11	6	16	± 42
23	12	7	16	± 41
24	12	7	17	± 40
25	13	8	17	± 39
26	13	8	18	± 38
27	14	8	19	± 38
28	14	9	19	± 37
29	15	9	20	± 36
30	15	10	20	± 36

^a là số khuôn lạc đếm được trên hai đĩa Petri ở một độ pha loãng.

^b là số đếm trung bình từ hai đĩa Petri;

^c được so sánh với số lượng vi sinh vật tính được và giả sử rằng số đếm được thực hiện trên hai đĩa ở một độ pha loãng.

Bảng B.5 – Khoảng tin cậy đối với việc định lượng với hệ thống “hai đĩa cho một độ pha loãng”, trường hợp trên hai đĩa ở hai độ pha loãng cho số đếm thấp

Số đếm khuẩn lạc ^a	Số đếm vi sinh vật ^b	Giới hạn tin cậy ở mức tin cậy xấp xỉ 95 % ^c		Phản trăm giới hạn tin cậy
		Giới hạn dưới	Giới hạn trên	
1	NA ^d	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA
3	NA	NA	NA	NA
4	NA	NA	NA	NA
5	NA	NA	NA	NA
6	NA	NA	NA	NA
7	NA	NA	NA	NA
8	NA	NA	NA	NA
9	NA	NA	NA	NA
10	NA	NA	NA	NA
11	NA	NA	NA	NA
12	5	2	9	± 57
13	6	3	9	± 54
14	6	3	10	± 52
15	7	3	10	± 51
16	7	4	11	± 49
17	8	4	11	± 48
18	8	4	12	± 46
19	9	5	13	± 45
20	9	5	13	± 44
21	10	5	14	± 43
22	10	6	14	± 42
23	10	6	15	± 41
24	11	7	15	± 40
25	11	7	16	± 39
26	12	7	16	± 38
27	12	8	17	± 38
28	13	8	17	± 37
29	13	8	18	± 36
30	14	9	19	± 36

^a là số khuẩn lạc được trên hai đĩa Petri ở hai độ pha loãng liên tiếp.

^b là số đếm trung bình từ hai đĩa Petri;

^c được so sánh với số lượng vi sinh vật tính được và giả sử rằng số đếm được thực hiện trên hai đĩa với hai độ pha loãng;

^d không có kết quả; không tính được số đếm trung bình.

NA: không áp dụng.

Phụ lục C
(Quy định)

Xác định số có xác xuất lớn nhất

**Bảng C.1 – Các giá trị MPN trên phần mẫu thử và các giới hạn tin cậy 95 %
đối với dây 10 ống, được tính theo Tài liệu tham khảo [29]**

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

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

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

Bảng C.3 – Các giá trị MPN trên phần mẫu thử và các giới hạn tin cậy 95 % đối với dãy 20 ống, được tính theo tài liệu tham khảo [29]

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

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

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

Bảng C.5 – Các giá trị MPN trên gam mẫu thử và các giới hạn tin cậy 95 %

(sử dụng ba phần mẫu thử 1 g, ba phần mẫu thử 0,1 g và ba phần mẫu thử 0,01 g) Tài liệu tham khảo [56]

Các kết quả dương tính với thể tích chất cấy, ml hoặc g			MPN /ml. hoặc /g	$\log_{10}M$	Độ lệch chuẩn của $\log_{10}M$	Các giới hạn tin cậy 95 %		Chỉ số hiềm	Loại hiềm
0,00	0,10	0,01				Dưới	Trên		
0	0	0	0	NA ^a	NA ^a	0	1,1	1,00	1
0	1	0	0,31	-0,51	0,43	0,04	2,3	0,09	1
1	0	0	0,36	-0,44	0,44	0,05	2,7	1,00	1
1	0	1	0,72	-0,14	0,31	0,17	3,0	0,02	2
1	1	0	0,74	-0,13	0,31	0,18	3,1	0,21	1
1	2	0	1,1	0,04	0,26	0,35	3,7	0,02	2
2	0	0	0,92	-0,04	0,32	0,21	4,0	1,00	1
2	0	1	1,4	0,15	0,27	0,42	4,9	0,04	2
2	1	0	1,5	0,18	0,27	0,43	5,0	0,43	1
2	1	1	2,0	0,30	0,24	0,70	6,0	0,02	2
2	2	0	2,1	0,32	0,24	0,71	6,2	0,07	1
3	0	0	2,3	0,36	0,31	0,55	9,7	1,00	1
3	0	1	3,9	0,59	0,31	0,93	16	0,08	1
3	1	0	4,3	0,63	0,33	0,95	19	1,00	1
3	1	1	7,5	0,88	0,30	1,9	30	0,21	1
3	1	2	12	1,1	0,26	3,6	37	0,02	2
3	2	0	9,3	0,97	0,32	2,2	40	1,00	1
3	2	1	15	1,2	0,27	4,4	51	0,42	1
3	2	2	22	1,3	0,24	7,2	64	0,07	1
3	3	0	24	1,4	0,32	5,6	100	1,00	1
3	3	1	46	1,7	0,34	9,6	220	1,00	1
3	3	2	110	2,0	0,32	25	490	1,00	1
3	3	3	–	NA ^a	NA ^a	36	–	1,00	1

^a không áp dụng.

Bảng C.6 – Các giá trị MPN trên gam mẫu thử và các giới hạn tin cậy 95 %

(sử dụng năm phần mẫu thử 1 g, năm phần mẫu thử 0,1 g và năm phần mẫu thử 0,01 g) Tài liệu tham khảo [56])

Các kết quả dương tính với thể tích chất cấy, ml hoặc g			MPN /ml hoặc /g	$\log_{10}M$	Độ lệch chuẩn của $\log_{10}M$	Các giới hạn tin cậy 95 %		Chỉ số kiểm	Loại
1	0,1	0,01				Dưới	Trên		
0	0	0	0	NA	NA	0	0,66	1	1
0	1	0	0,18	-0,74	0,43	0,02	1,34	0,09	1
1	0	0	0,20	-0,70	0,44	0,03	1,47	1,00	1
1	0	1	0,40	-0,40	0,31	0,10	1,65	0,02	2
1	1	0	0,40	-0,39	0,31	0,10	1,66	0,21	1
1	2	0	0,61	-0,21	0,25	0,19	1,96	0,02	2
2	0	0	0,45	-0,35	0,31	0,11	1,86	1,00	1
2	0	1	0,68	-0,17	0,25	0,21	2,18	0,03	2
2	1	0	0,68	-0,16	0,25	0,21	2,2	0,35	1
2	1	1	0,92	-0,04	0,22	0,33	2,55	0,02	2
2	2	0	0,93	-0,03	0,22	0,34	2,58	0,06	1
3	0	0	0,78	-0,11	0,26	0,24	2,54	1,00	1
3	0	1	1,1	0,03	0,23	0,38	2,97	0,05	1
3	1	0	1,1	0,03	0,23	0,38	3,02	0,57	1
3	1	1	1,4	0,14	0,20	0,54	3,48	0,03	2
3	2	0	1,4	0,14	0,20	0,54	3,53	0,15	1
3	2	1	1,7	0,23	0,19	0,72	4,02	0,13	2
3	3	0	1,7	0,24	0,19	0,73	4,09	0,03	2
4	0	0	1,3	0,11	0,23	0,44	3,72	1,00	1
4	0	1	1,7	0,22	0,21	0,63	4,4	0,08	1
4	1	0	1,7	0,23	0,21	0,63	4,5	0,92	1
4	1	1	2,1	0,33	0,20	0,85	5,28	0,07	1
4	2	0	2,2	0,33	0,20	0,86	5,41	0,31	1
4	2	1	2,6	0,42	0,19	1,1	6,31	0,03	2
4	3	0	2,7	0,43	0,19	1,1	6,5	0,07	1

(Bảng C.6 – Kết thúc)

Các kết quả dương tính với thể tích chất cây, ml hoặc g			MPN /ml hoặc /g	$\log_{10}M$	Độ lệch chuẩn của $\log_{10}M$	Các giới hạn tin cậy 95 %		Chỉ số hiêm	Loại
1	0,1	0,01				Dưới	Trên		
4	4	0	3,4	0,53	0,18	1,5	7,8	0,01	2
5	0	0	2,3	0,36	0,24	0,76	7,0	0,77	1
5	0	1	3,1	0,50	0,24	1,1	9,4	0,09	1
5	1	0	3,3	0,52	0,24	1,1	10	1,00	1
5	1	1	4,6	0,66	0,25	1,5	14	0,20	1
5	1	2	6,3	0,80	0,24	2,1	19	0,02	2
5	2	0	4,9	0,69	0,26	1,5	16	1,00	1
5	2	1	7,0	0,85	0,25	2,3	22	0,36	1
5	2	2	9,4	0,97	0,22	3,4	26	0,06	1
5	3	0	7,9	0,90	0,25	2,5	25	1,00	1
5	3	1	11	1,0	0,23	3,9	31	0,57	1
5	3	2	14	1,1	0,20	5,5	36	0,15	1
5	3	3	18	1,2	0,19	7,4	42	0,03	2
5	4	0	13	1,1	0,23	4,5	38	1,00	1
5	4	1	17	1,2	0,21	6,5	46	0,94	1
5	4	2	22	1,3	0,20	8,8	56	0,30	1
5	4	3	28	1,4	0,19	11,5	67	0,07	1
5	4	4	35	1,5	0,18	14,8	81	0,01	2
5	5	0	24	1,4	0,24	7,79	74	0,74	1
5	5	1	35	1,5	0,25	10,9	111	1,00	1
5	5	2	54	1,7	0,27	15,7	187	1,00	1
5	5	3	92	2,0	0,26	28	301	1,00	1
5	5	4	160	2,2	0,24	53	489	1,00	1
5	5	5	∞	NA	NA	65	∞	1,00	1

Bảng C.7 – Các giá trị MPN trên gam mẫu thử và các giới hạn tin cậy 95 %

(sử dụng 10 phần mẫu thử 1 g, 10 phần mẫu thử 0,1 g và 10 phần mẫu thử 0,01 g, Tài liệu tham khảo [56])

Các kết quả dương tính với thể tích chất cấy, ml hoặc g			MPN /ml hoặc /g	$\log_{10}M$	Độ lệch chuẩn của $\log_{10}M$	Các giới hạn tin cậy 95 %		Chỉ số hiêm	Loại
1	0,1	0,01				Dưới	Trên		
0	0	0	0	NA	NA	0	0,33	1,00	1
0	1	0	0,09	-1	0,43	0,012	0,67	0,09	1
1	0	0	0,09	-1	0,43	0,013	0,7	0,99	1
1	0	1	0,19	-0,72	0,31	0,046	0,78	0,02	2
1	1	0	0,19	-0,72	0,31	0,046	0,78	0,19	1
1	2	0	0,29	-0,54	0,25	0,09	0,91	0,03	2
2	0	0	0,2	-0,7	0,31	0,048	0,82	0,99	1
2	0	1	0,3	-0,52	0,25	0,094	0,95	0,03	2
2	1	0	0,3	-0,52	0,25	0,094	0,95	0,30	1
2	1	1	0,4	-0,4	0,22	0,15	1,1	0,01	2
2	2	0	0,4	-0,4	0,22	0,15	1,1	0,06	1
3	0	0	0,32	-0,5	0,25	0,099	1	0,99	1
3	0	1	0,42	-0,38	0,22	0,15	1,2	0,04	2
3	1	0	0,42	-0,37	0,22	0,15	1,2	0,43	1
3	1	1	0,53	-0,27	0,2	0,22	1,3	0,02	2
3	2	0	0,53	-0,27	0,2	0,22	1,3	0,11	1
3	3	0	0,65	-0,19	0,18	0,28	1,5	0,02	2
4	0	0	0,45	-0,35	0,22	0,16	1,2	0,99	1
4	0	1	0,56	-0,25	0,2	0,23	1,4	0,06	1
4	1	0	0,56	-0,25	0,2	0,23	1,4	0,58	1

(Bảng C.7 – tiếp theo)

Các kết quả dương tính với thử tích chất cấy, ml hoặc g			MPN /ml hoặc /g	$\log_{10}M$	Độ lệch- chuẩn của $\log_{10}M$	Các giới hạn tin cậy 95 %		Chỉ số hiếm	Loại
1	0,1	0,01				Dưới	Trên		
4	1	1	0,68	-0,17	0,18	0,3	1,6	0,04	2
4	2	0	0,68	-0,16	0,18	0,3	1,6	0,19	1
4	2	1	0,8	-0,096	0,17	0,37	1,7	0,02	2
4	3	0	0,81	-0,094	0,17	0,37	1,7	0,05	2
5	0	0	0,6	-0,22	0,2	0,24	1,5	0,98	1
5	0	1	0,72	-0,14	0,18	0,31	1,7	0,07	1
5	1	0	0,73	-0,14	0,18	0,32	1,7	0,75	1
5	1	1	0,85	-0,068	0,17	0,39	1,8	0,07	1
5	2	0	0,86	-0,066	0,17	0,4	1,9	0,32	1
5	2	1	0,99	-0,0047	0,16	0,48	2	0,03	2
5	3	0	1	-0,0021	0,16	0,48	2,1	0,09	1
5	4	0	1,1	0,055	0,15	0,57	2,3	0,02	2
6	0	0	0,78	-0,11	0,18	0,34	1,8	0,98	1
6	0	1	0,92	-0,038	0,17	0,42	2	0,09	1
6	1	0	0,92	-0,035	0,17	0,42	2	0,97	1
6	1	1	1,1	0,027	0,16	0,51	2,2	0,10	1
6	2	0	1,1	0,03	0,16	0,51	2,2	0,46	1
6	2	1	1,2	0,085	0,15	0,61	2,4	0,05	1
6	3	0	1,2	0,088	0,15	0,61	2,5	0,15	1
6	3	1	1,4	0,14	0,14	0,71	2,7	0,02	2

(Bảng C.7 – tiếp theo)

Các kết quả dương tính với thử tích chất cấy, ml hoặc g			MPN /ml hoặc /g	$\log_{10}M$	Độ lệch chuẩn của $\log_{10}M$	Các giới hạn tin cậy 95 %		Chỉ số hiếm	Loại
1	0,1	0,01				Dưới	Trên		
6	4	0	1,4	0,14	0,14	0,71	2,7	0,04	2
7	0	0	1	-0,0018	0,17	0,45	2,2	0,93	1
7	0	1	1,1	0,062	0,16	0,55	2,4	0,09	1
7	1	0	1,2	0,065	0,16	0,55	2,4	1,00	1
7	1	1	1,3	0,12	0,15	0,65	2,7	0,13	1
7	2	0	1,3	0,13	0,15	0,66	2,7	0,61	1
7	2	1	1,5	0,18	0,15	0,77	3	0,08	1
7	3	0	1,5	0,18	0,15	0,77	3	0,24	1
7	3	1	1,7	0,23	0,14	0,89	3,2	0,04	2
7	4	0	1,7	0,23	0,14	0,89	3,3	0,08	1
7	4	1	1,9	0,28	0,14	1	3,5	0,01	2
7	5	0	1,9	0,28	0,14	1	3,6	0,02	2
8	0	0	1,3	0,11	0,16	0,6	2,7	0,71	1
8	0	1	1,5	0,17	0,16	0,71	3	0,09	1
8	1	0	1,5	0,17	0,16	0,72	3	1,00	1
8	1	1	1,7	0,22	0,15	0,84	3,3	0,17	1
8	1	2	1,9	0,27	0,14	0,97	3,7	0,01	2
8	2	0	1,7	0,23	0,15	0,84	3,4	0,83	1
8	2	1	1,9	0,28	0,15	0,97	3,7	0,14	1
8	2	2	2,1	0,33	0,14	1,1	4	0,01	2

(Bảng C.7 – tiếp theo)

Các kết quả dương tính với thử tích chất cầy, ml hoặc g			MPN /ml hoặc /g	$\log_{10}M$	Độ lệch chuẩn của $\log_{10}M$	Các giới hạn tin cậy 95 %		Chi số hiếm	Loại
1	0,1	0,01				Dưới	Trên		
8	3	0	1,9	0,28	0,15	0,98	3,7	0,42	1
8	3	1	2,1	0,33	0,14	1,1	4,1	0,08	1
8	4	0	2,2	0,33	0,14	1,1	4,1	0,16	1
8	4	1	2,4	0,38	0,14	1,3	4,5	0,04	2
8	5	0	2,4	0,38	0,14	1,3	4,6	0,05	2
8	5	1	2,7	0,43	0,13	1,4	5	0,01	2
8	6	0	2,7	0,43	0,13	1,5	5	0,01	2
9	0	0	1,7	0,22	0,16	0,79	3,5	0,53	1
9	0	1	1,9	0,28	0,16	0,93	3,9	0,09	1
9	1	0	1,9	0,29	0,16	0,94	4	1,00	1
9	1	1	2,2	0,34	0,15	1,1	4,4	0,20	1
9	1	2	2,5	0,39	0,15	1,2	4,9	0,02	2
9	2	0	2,2	0,35	0,15	1,1	4,5	1,00	1
9	2	1	2,5	0,4	0,15	1,3	5	0,22	1
9	2	2	2,8	0,45	0,15	1,4	5,5	0,02	2
9	3	0	2,5	0,41	0,15	1,3	5,1	0,66	1
9	3	1	2,9	0,46	0,15	1,5	5,6	0,16	1
9	3	2	3,2	0,51	0,14	1,7	6,3	0,02	2
9	4	0	2,9	0,46	0,15	1,5	5,8	0,31	1
9	4	1	3,3	0,51	0,15	1,7	6,4	0,09	1

(Bảng C.7 – tiếp theo)

Các kết quả dương tính với thể tích chất cấy, ml hoặc g			MPN /ml hoặc /g	$\log_{10}M$	Độ lệch chuẩn của $\log_{10}M$	Các giới hạn tin cậy 95 %		Chỉ số hiếm	Loại
1	0,1	0,01				Dưới	Trên		
9	4	2	3,7	0,56	0,14	1,9	7,1	0,01	2
9	5	0	3,3	0,52	0,15	1,7	6,5	0,12	1
9	5	1	3,7	0,57	0,14	1,9	7,2	0,04	2
9	6	0	3,8	0,58	0,15	2	7,4	0,04	2
9	6	1	4,3	0,63	0,14	2,2	8,2	0,02	2
9	7	0	4,3	0,64	0,14	2,2	8,4	0,01	2
10	0	0	2,3	0,36	0,17	1,1	5,1	0,3	1
10	0	1	2,7	0,43	0,17	1,2	5,9	0,06	1
10	1	0	2,8	0,44	0,17	1,3	6	0,70	1
10	1	1	3,2	0,51	0,17	1,5	7	0,19	1
10	1	2	3,8	0,58	0,17	1,7	8,3	0,03	2
10	2	0	3,3	0,52	0,17	1,5	7,3	0,96	1
10	2	1	3,9	0,59	0,17	1,7	8,6	0,31	1
10	2	2	4,6	0,66	0,17	2	10	0,06	1
10	3	0	4	0,60	0,18	1,8	9	1,00	1
10	3	1	4,7	0,68	0,18	2,1	11	0,46	1
10	3	2	5,6	0,75	0,18	2,5	13	0,11	1
10	3	3	6,6	0,82	0,17	3	15	0,02	2
10	4	0	4,9	0,69	0,18	2,1	11	1,00	1
10	4	1	5,9	0,77	0,18	2,6	13	0,61	1

(Bảng C.7 – tiếp theo)

Các kết quả dương tính với thử tích chất cầy, ml hoặc g			MPN /ml hoặc /g	$\log_{10}M$	Độ lệch chuẩn của $\log_{10}M$	Các giới hạn tin cậy 95 %		Chỉ số hiếm	Loại
1	0,1	0,01				Dưới	Trên		
10	4	2	7	0,84	0,17	3,2	16	0,19	1
10	4	3	8,2	0,91	0,16	3,8	17	0,05	2
10	5	0	6,2	0,79	0,18	2,7	14	1,00	1
10	5	1	7,4	0,87	0,18	3,3	17	0,77	1
10	5	2	8,7	0,94	0,17	4,1	19	0,32	1
10	5	3	10	1	0,16	4,9	21	0,09	1
10	5	4	12	1,1	0,15	5,8	23	0,02	2
10	6	0	7,9	0,9	0,18	3,5	18	1,00	1
10	6	1	9,4	0,97	0,17	4,3	20	0,98	1
10	6	2	11	1	0,16	5,2	23	0,46	1
10	6	3	12	1,1	0,15	6,2	25	0,15	1
10	6	4	14	1,1	0,14	7,2	27	0,04	2
10	7	0	10	1	0,17	4,6	22	0,94	1
10	7	1	12	1,1	0,16	5,6	25	1,00	1
10	7	2	14	1,1	0,15	6,7	28	0,6	1
10	7	3	15	1,2	0,15	7,9	30	0,24	1
10	7	4	17	1,2	0,14	9,1	33	0,08	1
10	7	5	19	1,3	0,14	10	36	0,02	2
10	8	0	13	1,1	0,16	6,1	28	0,72	1
10	8	1	15	1,2	0,16	7,3	31	1,00	1

(Bảng C.7 – kết thúc)

Các kết quả dương tính với thể tích chất cầy, ml hoặc g			MPN /ml hoặc /g	$\log_{10}M$	Độ lệch chuẩn của $\log_{10}M$	Các giới hạn tin cậy 95 %		Chỉ số hiếm	Loại
1	0,1	0,01				Dưới	Trên		
10	8	2	17	1,2	0,15	8,6	35	0,83	1
10	8	3	20	1,3	0,15	10	38	0,42	1
10	8	4	22	1,3	0,14	12	42	0,16	1
10	8	5	25	1,4	0,14	13	47	0,05	2
10	9	0	17	1,2	0,16	8	36	0,54	1
10	9	1	20	1,3	0,16	9,6	41	1,00	1
10	9	2	23	1,4	0,15	11	46	1,00	1
10	9	3	26	1,4	0,15	13	53	0,62	1
10	9	4	30	1,5	0,15	15	60	0,3	1
10	9	5	35	1,5	0,15	17	69	0,12	1
10	9	6	40	1,6	0,15	20	78	0,04	2
10	9	7	46	1,7	0,15	23	90	0,01	2
10	10	0	24	1,4	0,17	11	53	0,30	1
10	10	1	29	1,5	0,17	13	64	0,67	1
10	10	2	35	1,5	0,18	15	79	0,90	1
10	10	3	43	1,6	0,18	18	100	1,00	1
10	10	4	54	1,7	0,19	23	130	1,00	1
10	10	5	70	1,8	0,19	29	170	1,00	1
10	10	6	92	2	0,18	40	210	1,00	1
10	10	7	120	2,1	0,17	54	270	1,00	1
10	10	8	160	2,2	0,17	73	350	1,00	1
10	10	9	230	2,4	0,18	100	520	1,00	1
10	10	10	∞	NA	NA	120	∞	1,00	1

Phụ lục D

(Quy định)

Đếm khuẩn lạc với hai đĩa trên một độ pha loãng**D.1 Giới thiệu**

Phụ lục này quy định các trường hợp tính và biểu thị kết quả đếm cụ thể với hai đĩa trên một độ pha loãng.

Áp dụng tất cả các yêu cầu và khuyến cáo nêu trong 10.3.

Trong phụ lục này chỉ đưa ra các yêu cầu khác và các diễn giải cần thiết.

D.2 Đếm khuẩn lạc

Áp dụng các yêu cầu và khuyến cáo nêu trong 10.3.1 và 10.3.2.1.1.

Sau thời gian nuôi cấy như nêu trong tiêu chuẩn cụ thể. Đếm khuẩn lạc (tổng số khuẩn lạc. Khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc nghỉ ngơi) cho từng đĩa chứa đến và bao gồm 300 khuẩn lạc (hoặc số đếm bất kỳ khác nêu trong tiêu chuẩn cụ thể).

Trong điều này, các trường hợp có liên quan tương ứng với các trường hợp chung sau đây:

- nuôi cấy một đĩa Petri đường kính 90 mm cho một độ pha loãng; và thực hiện ít nhất cho hai độ pha loãng liên tiếp;
- số đếm tối đa đối với các khuẩn lạc có mặt: 300 trên mỗi đĩa;
- tổng số đếm khuẩn lạc tối đa (điển hình và không điển hình) có mặt trên một đĩa khi đếm các khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc giả định: tốt nhất là 300 trên một đĩa;
- số đếm tối đa khuẩn điển hình hoặc giả định: 150 trên một đĩa;
- số khuẩn lạc giả định được nuôi cấy để nhận biết hoặc khẳng định (xem D.4), trong từng đĩa được giữ lại: thường là 5.

Những con số này sẽ được xác định trong các tiêu chuẩn cụ thể.

Các phương pháp tính được xác định sau đây là các trường hợp thường gặp nhất khi thử nghiệm được thực hiện phù hợp với thực hành phòng thử nghiệm tốt. Các trường hợp đặc biệt đôi khi có thể

xảy ra (ví dụ: số khuẩn lạc trên hai đĩa ở cùng độ pha loãng có thể có khác nhau đáng kể hoặc tỷ lệ các hệ số pha loãng sử dụng cho hai độ pha loãng liên tiếp có thể rất khác nhau), do đó việc kiểm tra và giải thích các kết quả thu được cần do người phân tích vi sinh đã được đào tạo thực hiện, nếu cần, có thể loại bỏ.

D.3 Phương pháp tính: trường hợp chung (đếm tổng số khuẩn lạc hoặc khuẩn lạc điển hình)

Để kết quả có giá trị, thường cần đếm số khuẩn lạc trên ít nhất một đĩa chứa tối thiểu 10 khuẩn lạc [tổng số khuẩn lạc, khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc đáp ứng được các tiêu chí nhận biết hoặc tiêu chí khẳng định (D.4)].

Nếu sử dụng hai đĩa Petri cho mỗi độ pha loãng, thì tỷ số giữa số đếm khuẩn lạc trên đĩa thứ nhất và số đếm trên đĩa thứ hai cần bằng một.

Khuyến cáo rằng các giới hạn được quy định bởi các phòng thử nghiệm về việc đếm khuẩn lạc trên đĩa thứ hai.

Các giới hạn này có thể được nêu trong TCVN 9330-2 (ISO 14461-2) ^[42].

Khi các giới hạn này không được như dự kiến, thì phải giải thích kết quả một cách thận trọng.

Ví Dụ 1: Nếu số đếm khuẩn lạc trên đĩa thứ nhất có số đếm cao hơn, ví dụ 250, thì số đếm khuẩn lạc trên đĩa thứ hai với số đếm thấp hơn nhưng không thấp hơn 196 [xem TCVN 9330-2 (ISO 14461-2)] ^[42].

Có thể áp dụng khuyến nghị về tỷ lệ giữa số đếm khuẩn lạc tại các độ pha loãng d_1 và d_2 (10.3.2.2).

Tính số N vi sinh vật có mặt trong mẫu thử là số đếm trung bình từ hai độ pha loãng liên tiếp sử dụng Công thức (D.1):

$$N = \frac{\sum C}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d} \quad (\text{D.1})$$

Trong đó:

$\sum C$ là tổng của các khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại thu được từ hai độ pha loãng liên tiếp và có ít nhất một đĩa chứa tối thiểu 10 khuẩn lạc;

V là thể tích chất cấy áp dụng cho mỗi đĩa, tính bằng millilit (ml);

n_1 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ nhất;

n_2 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ hai;

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

Làm tròn kết quả tính được đến hai chữ số sau dấu phẩy. Để làm tròn, nếu con số thứ ba nhỏ hơn 5 thì không sửa đổi con số trước đó; Nếu con số thứ ba bằng hoặc lớn hơn 5, thì tăng số đứng trước lên một đơn vị.

Lấy kết quả là một con số giữa 1,0 đến 9,9 nhân với lũy thừa điện thích hợp của 10 hoặc số nguyên với hai con số có nghĩa.

Biểu thị kết quả như sau:

- số N vi sinh vật trên millilit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (sản phẩm dạng khác).

Ví dụ 2: Việc đếm cho các kết quả như sau:

- ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) giữ lại: 163 và 215 khuẩn lạc;
- ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) giữ lại: 14 và 25 khuẩn lạc.

$$N = \frac{\sum C}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1 \times [2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19182$$

Bằng cách làm tròn kết quả như trên, số lượng vi sinh vật là 19 000 hoặc $1,9 \times 10^4$ trên millilit hoặc trên gam sản phẩm.

D.4 Phương pháp tính: Trường hợp sau khi nhận biết hoặc khẳng định

Khi phương pháp được sử dụng để nhận biết hoặc khẳng định, số lượng được cho trước A (thường là 5) khuẩn lạc giả định được nuôi cấy từ mỗi đĩa được giữ lại để đếm Khuẩn lạc. Sau khi nhận biết hoặc khẳng định phép tính đối với mỗi đĩa, số a khuẩn lạc đáp ứng các tiêu chí nhận biết hoặc tiêu chí xác định được tính bằng Công thức (D.2):

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

Trong đó:

b là số khuẩn lạc đáp ứng được các tiêu chí nhận biết hoặc tiêu chí khẳng định trong số các khuẩn lạc A được nuôi cấy;

C là tổng số các khuẩn lạc giả định nghỉ ngơi cho được giữ lại trên đĩa.

Làm tròn kết quả tính đến số nguyên gần nhất. Để làm tròn, nếu con số đầu tiên sau dấu phẩy nhỏ hơn 5, thì không sửa đổi con số đứng trước; Nếu con số đầu tiên sau dấu phẩy bằng hoặc lớn hơn 5, thì tăng con số đứng trước lên một đơn vị.

Tính số N , N_E hoặc N' của các vi sinh vật đã được nhận biết hoặc khẳng định có trong mẫu thử, thay ΣC bằng Σa sử dụng công thức trong D.3, D.5.1 và D.7.3, tương ứng.

Làm tròn kết quả theo khuyến cáo trong D.3.

Biểu thị kết quả như trong D.3, D.5.1 và D.7.3, tương ứng.

Ví dụ: Việc đếm cho các kết quả như sau:

- Ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-3}) giữ lại: 66 và 80 khuẩn lạc;
- Ở độ pha loãng thứ hai (10^{-4}) giữ lại: 4 và 7 khuẩn lạc.

Tiến hành kiểm tra các khuẩn lạc đã được chọn:

- đối với 66 khuẩn lạc, 8 khuẩn lạc, 6 trong số các khuẩn lạc đó đáp ứng các tiêu chí, do đó $a = 50$;
- đối với 80 khuẩn lạc, 9 khuẩn lạc, 6 trong số khuẩn lạc đó đáp ứng được các tiêu chí; do đó $a = 53$;
- đối với 7 khuẩn lạc, 5 khuẩn lạc, 4 trong số khuẩn lạc đó đáp ứng được các tiêu chí; do đó $a = 6$;
- đối với 4 khuẩn lạc, tất cả 4 khuẩn lạc đáp ứng được các tiêu chí; do đó $a = 4$.

$$N = \frac{\sum a}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d} = \frac{50 + 53 + 6 + 4}{1 \times [2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-3}} = \frac{113}{0,0022} = 51364$$

Bằng cách làm tròn kết quả theo khuyến cáo trong D.3, số lượng vi sinh vật là 51 000 hoặc $5,1 \times 10^4$ trong một mililit hoặc trên sản phẩm.

D.5 Phương pháp tính: các số đếm ước tính

D.5.1 Trường hợp hai đĩa (mẫu thử hoặc huyền phù ban đầu hoặc dung dịch pha loãng thứ nhất) có chứa ít hơn 10 khuẩn lạc

Có thể áp dụng các yêu cầu và khuyến cáo nêu trong 10.3.2.4.1 liên quan đến giới hạn dưới của phép xác định.

Nếu cả hai đĩa mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc chứa huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác), hoặc từ dung dịch pha loãng thứ nhất đã được nuôi cấy hoặc được giữ lại, chứa ít hơn 10 khuẩn lạc (tổng số khuẩn lạc, khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc đáp ứng được các tiêu chí nhận biết hoặc tiêu chí khẳng định) và bộ hai đĩa chứa ít nhất 4 khuẩn lạc, tính số lượng ước tính N_E của các vi sinh vật có mặt trong mẫu thử là trung bình cộng của các khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa sử dụng Công thức (D.3):

$$N_E = \frac{\sum C}{Vnd} \quad (D.3)$$

Trong đó:

$\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa;

V là thể tích chất cấy áp dụng cho từng đĩa, tính bằng millilit (ml);

n là số lượng đĩa được giữ lại (trong trường hợp này $n = 2$);

d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu hoặc của dung dịch pha loãng đầu tiên được nuôi cấy hoặc được giữ lại [$d = 1$ khi sản phẩm dạng lỏng không pha loãng (mẫu thử) được sử dụng].

Làm tròn kết quả theo khuyến cáo trong D.3.

Biểu thị kết quả như sau:

- số ước tính N_E vi sinh vật trên millilit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (sản phẩm dạng khác).

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

- ở đĩa pha loãng thứ nhất (10^{-3}) giữ lại: 8 và 9 khuẩn lạc đếm được

$$N_E = \frac{8 + 9}{1 \times 2 \times 10^{-2}} \frac{17}{0,02} = 850$$

Bằng cách làm tròn kết quả theo khuyến cáo trong D.3, số ước tính N_E vi sinh vật là 850 hoặc $8,5 \times 10^2$ trên millilit hoặc trên gam sản phẩm.

D.5.2 Trường hợp hai đĩa (mẫu thử hoặc huyền phù ban đầu hoặc dung dịch pha loãng thứ nhất) không chứa khuẩn lạc nào

Nếu hai đĩa chứa mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) hoặc từ dung dịch pha loãng đầu tiên được nuôi cấy hoặc được giữ lại không chứa khuẩn lạc nào thì báo cáo kết quả như sau:

ít hơn 1/Vd vi sinh vật trên millilit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (sản phẩm dạng khác);

Trong đó:

V là thể tích chất cấy được sử dụng trong mỗi đĩa, tính bằng millilit (ml);

d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu hoặc của dung dịch pha loãng thứ nhất được nuôi cấy hoặc được giữ lại [$d = 1$ khi sản phẩm dạng lỏng không pha loãng (mẫu thử) được sử dụng, $d = 0,1$ khi sử dụng dung dịch pha loãng 10^{-1} , v.v...].

D.6 Trường hợp đặc biệt (đếm các khuẩn lạc nghỉ ngơi hoặc khuẩn lạc điển hình)

D.6.1 Nếu tất cả các khuẩn lạc điển hình và không điển hình đối với hai đĩa có chứa dung dịch pha loãng thứ nhất d_1 lớn hơn 300 (hoặc số bất kỳ khác nêu trong tiêu chuẩn cụ thể), với các khuẩn lạc điển hình có thể nhìn thấy hoặc khuẩn lạc đã được khẳng định và nếu đối với hai đĩa chứa dung dịch pha loãng tiếp theo d_2 chứa đến và bao gồm 300 khuẩn lạc (hoặc số bất kỳ số khác nêu trong tiêu chuẩn cụ thể) không có khuẩn lạc điển hình hoặc khẳng định có thể được tính thì báo cáo kết quả như sau:

ít hơn $1/V_2d_2$ và nhiều hơn $1/V_1d_1$ vi sinh vật trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (sản phẩm dạng khác);

Trong đó:

V_1, V_2 là các thể tích chất cấy đưa vào mỗi đĩa đối với mỗi độ pha loãng d_1 và d_2 , tính bằng mililit (ml);

d_1, d_2 là các hệ số pha loãng.

Ví dụ: Việc đếm đã sản xuất các kết quả như sau:

– Ở độ pha loãng thứ nhất (10^2) giữ lại: cả hai đĩa mỗi đĩa chứa nhiều hơn 300 khuẩn lạc, khi có mặt các khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc được khẳng định.

– Ở độ pha loãng thứ hai (10^3) giữ lại: 33 và 35 khuẩn lạc, không có mặt các khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc được khẳng định.

Biểu thị kết quả là có ít hơn 1 000 và nhiều hơn 100 vi sinh vật trong một mililit hoặc trên gam sản phẩm.

D.6.2 Nếu tất cả các khuẩn lạc điển hình và không điển hình trên hai đĩa chứa dung dịch pha loãng thứ nhất d_1 lớn hơn 300 (hoặc số bất kỳ khác nêu trong tiêu chuẩn cụ thể), mà không nhìn thấy có khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc được khẳng định và nếu hai đĩa chứa dung dịch pha loãng tiếp theo d_2 có chứa đến và bao gồm 300 khuẩn lạc (hoặc số bất kỳ khác nêu trong tiêu chuẩn cụ thể) không có khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc được khẳng định, thì báo cáo kết quả như sau:

ít hơn $1/V_2d_2$ vi sinh vật trên mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (sản phẩm dạng khác);

Trong đó:

V_2 là thể tích chất cấy đưa vào mỗi đĩa đối với độ pha loãng tiếp theo d_2 , tính bằng mililit (ml);

d_2 là hệ số pha loãng.

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

- Ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) giữ lại: cả hai đĩa mỗi đĩa chứa nhiều hơn 300 khuẫn lạc, khi không có mặt các khuẫn lạc điển hình hoặc khuẫn lạc được khẳng định.

- Ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) giữ lại: 33 và 35 khuẫn lạc, không có mặt các khuẫn lạc điển hình hoặc khuẫn lạc được khẳng định.

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

D.7 Phương pháp tính: Trường hợp đặc biệt

Có thể áp dụng các yêu cầu và các khuyến cáo trong 10.3.2.5.

D.7.1 Nếu số khuẫn lạc đếm được (tổng số khuẫn lạc, khuẫn lạc điển hình hoặc khuẫn lạc nghỉ ngơi) lớn hơn số đếm tối đa có thể đếm được (300 hoặc số bất kỳ khác nêu trong tiêu chuẩn cụ thể) đối với hai đĩa chứa dung dịch pha loãng thứ nhất d_1 ; với số khuẫn lạc (tổng số khuẫn lạc, khuẫn lạc điển hình hoặc khuẫn lạc đáp ứng các tiêu chí nhận biết hoặc được khẳng định) nhỏ hơn 10 (giới hạn số đếm thấp) của hai đĩa chứa dung dịch pha loãng tiếp theo d_2 , thì biểu thị kết quả như sau:

CHÚ THÍCH: Trong phần này chỉ đưa ra các ví dụ.

c) Nếu số khuẫn lạc của hai đĩa chứa dung dịch pha loãng d_1 , nằm trong dải [số đếm tối đa cộng thêm 1, giới hạn trên của khoảng tin cậy đối với số đếm tối đa] (ví dụ 301 đến 324) (Phụ lục B) và số đếm khuẫn lạc của hai đĩa chứa dung dịch pha loãng d_2 không nhỏ hơn giới hạn dưới quy định trong 10.3.2.2, sử dụng phương pháp tính cho các trường hợp chung (xem D.3).

VÍ DỤ 1: Việc đếm (khi số lượng tối đa 300 đã được thiết lập để đếm khuẫn lạc) cho các kết quả sau:

- Ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) giữ lại: 310 và 322 khuẫn lạc (thấp hơn 324, giới hạn trên của khoảng tin cậy là 300);

- Ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) giữ lại: 8 và 12 khuẫn lạc, các giới hạn dưới của số đếm khuẫn lạc ở độ pha loãng (10^{-3}) là 18 và 19 khuẫn lạc được qui định từ 310 và 322 khuẫn lạc của độ pha loãng (10^{-2}).

Kết quả đếm khuẫn lạc này là không thể chấp nhận được.

VÍ DỤ 2: Việc đếm (khi số lượng tối đa 150 được thiết lập cho việc đếm khuẫn lạc) cho các kết quả như sau:

- Ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) giữ lại: 151 và 160 khuẫn lạc (nhỏ hơn 167, giới hạn trên của khoảng tin cậy là 150);

- Ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) giữ lại: 8 và 9 khuẫn lạc, các giới hạn dưới của số đếm khuẫn lạc ở độ pha loãng (10^{-3}) là 6 và 7 khuẫn lạc được xác định từ 151 và 160 khuẫn lạc của độ pha loãng 10^{-2} .

Sử dụng phương pháp tính cho các trường hợp chung (D.3) bằng cách sử dụng các đĩa đối với hai độ pha loãng được giữ lại.

d) Nếu số khuẩn lạc trên các đĩa chứa dung dịch pha loãng d_1 lớn hơn giới hạn trên của khoảng tin cậy đối với số đếm tối đa có thể đếm được (ví dụ: 324) và số đếm khuẩn lạc của dung dịch pha loãng d_2 đối với hai đĩa không nhỏ hơn giới hạn dưới quy định trong 10.3.2.2 và tính được từ giới hạn trên của khoảng tin cậy đối với số đếm tối đa, thì chỉ lấy số đếm của kết quả đếm của dung dịch d_2 và tính số đếm ước tính (D.5.1).

VÍ DỤ 3: Việc đếm (khi số đếm tối đa 300 được thiết lập để đếm khuẩn lạc) cho các kết quả sau đây:

- Ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-3}) giữ lại: trên hai đĩa mỗi đĩa nhiều hơn 324 khuẩn lạc;
- Ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) giữ lại: 7 và 9 khuẩn lạc, giới hạn dưới của số đếm khuẩn lạc ở độ pha loãng (10^{-3}) là 19 khuẩn lạc, được xác định từ 324 khuẩn lạc của độ pha loãng 10^{-2} .

Kết quả đếm khuẩn lạc này là không thể chấp nhận.

VÍ DỤ 4: Việc đếm (khi số tối đa 150 được thiết lập để đếm khuẩn lạc) cho các kết quả sau đây:

- Ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-3}) giữ lại: trên hai đĩa mỗi đĩa nhiều hơn 167 khuẩn lạc;
- Ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) giữ lại: 8 và 9 khuẩn lạc, giới hạn dưới của số đếm khuẩn lạc ở độ pha loãng (10^{-3}) là 8 khuẩn lạc được xác định từ 167 khuẩn lạc của độ pha loãng 10^{-2} .

Báo cáo số ước tính được theo số khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa từ độ pha loãng 10^{-3} (D.5.1).

VÍ DỤ 5: Việc đếm (khi số tối đa 150 được thiết lập để đếm khuẩn lạc) cho các kết quả sau đây:

- Ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-3}) giữ lại: trên hai đĩa mỗi đĩa nhiều hơn 187 khuẩn lạc;
- Ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) giữ lại: 5 và 7 khuẩn lạc, giới hạn dưới của số đếm khuẩn lạc ở độ pha loãng (10^{-3}) là 8 khuẩn lạc được xác định từ 167 khuẩn lạc của độ pha loãng 10^{-2} .

Kết quả của việc đếm khuẩn lạc này là không thể chấp nhận được.

D.7.2 Khi số đếm khuẩn lạc (tổng số khuẩn lạc, khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc giả định) đối với từng đĩa của tất cả các độ pha loãng đã nuôi cấy cho số đếm lớn hơn 300 (hoặc số bất kỳ khác nêu trong tiêu chuẩn cụ thể), thì báo cáo kết quả như sau:

"nhiều hơn 300/Vd" (trong trường hợp tổng số khuẩn lạc hoặc khuẩn điển hình) hoặc là

"nhiều hơn (300/Vd) x (b/A)" (trong trường hợp khuẩn lạc được khẳng định), tính theo số vi sinh vật trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc vi sinh vật trên gram (sản phẩm dạng khác).

Trong đó:

d là độ pha loãng của dung dịch nuôi cấy cuối cùng;

V là thể tích chất cấy được sử dụng trong mỗi đĩa, tính bằng mililit (ml);

b là số khuẩn lạc đáp ứng được các tiêu chí nhận biết trong số các khuẩn lạc được nuôi cấy A ;

D.7.3 Trường hợp chỉ có hai đĩa chứa dung dịch nuôi cấy cuối cùng là có thể đếm được và chứa đến và bao gồm 300 (hoặc số bất kỳ khác nêu trong tiêu chuẩn cụ thể) khuẩn lạc (tổng số khuẩn lạc, khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc giả định), thì tính số N vi sinh vật có mặt là trung bình cộng của các khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa, sử dụng Công thức (D.4):

$$N = \frac{\sum C}{V \times n \times d} \quad (\text{D.4})$$

Trong đó:

$\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa và có ít nhất một đĩa chứa tối thiểu 10 khuẩn lạc;

V là thể tích chất cấy áp dụng cho mỗi đĩa, tính bằng mililit (ml);

n là số đĩa được giữ lại (trong trường hợp này, $n = 2$);

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

Làm tròn kết quả theo khuyến cáo trong D.3.

Biểu thị kết quả như sau:

- số lượng N vi sinh vật trên mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (sản phẩm dạng khác).

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

- Ở độ pha loãng cuối cùng (10^{-4}) đã nuôi cấy: 120 và 130 khuẩn lạc:

$$N' = \frac{120 + 130}{1 \times 2 \times 10^{-4}} = \frac{250}{0,0002} = 1250000$$

Bằng cách làm tròn kết quả theo khuyến cáo trong D.3, số N của vi sinh vật là 1 300 000 hoặc $1,3 \times 10^6$ trên mililit hoặc trên gam sản phẩm.

Thư mục tài liệu tham khảo

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

- [15] HARREWIJN, G.A., and HARTOG, B.J. Guidelines to perform microbiological analyses of food and food products ("Good laboratory practice"), *De Ware(n)-Chemicus* 1979, 9, pp. 1-11
- [16] MUIR, G.D., ed. *Hazards in the chemical laboratory*, Royal Institute of Chemistry, London (1971)
- [17] WHO Laboratory biosafety manual, 3rd edition, Geneva: World Health Organization, 2004, 184 p. Available (viewed 2013-01-24) at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/en/Biosafety7.pdf>
- [18] LIGHTFOOT, N.F., MAIER, E.A. (eds). *Microbiological analysis of food and water – Guidelines for quality assurance*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands (1998)
- [19] HARRIGAN, W.F. and MCCANCE, M.E. *Laboratory methods in food and dairy microbiology*, Academic Press (1976)
- [20] *Laboratory safety at the Centers for Disease Control (CDC)*, NHEW Publication No. CDC 79-8118, Atlanta, 1979
- [21] *Laboratory safety at the Centers for Disease Control*, US Dept of Health, Education and Welfare (Public Health Service), Atlanta, 1979
- [22] GERHARDT, P., MURRAY, R.G.E., COSTILLOW, R.N., NESTER, E.W., KRIEG, N.R. and PHILLIPS, G.B. eds. *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC 20006 (1981)
- [23] GNANOU BESSE, N., AUDINET, N., BEAUFORT, A., COLIN, P., CORNU, M. and LOMBARD, B. A contribution to the improvement of *Listeria monocytogenes* enumeration in cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 91, pp. 119-27
- [24] *Microbiological testing laboratory accommodation guidelines*, National Association of Testing Authorities, Australia
- [25] *Microorganisms in foods – 1; Their significance and methods of enumeration*, ICM&F, University of Toronto Press (1968 update)
- [26] SHAPTON, DA, BOARD, R.G. and HAUSTER, W.J. eds. *Safety in microbiology*, Society for Applied Bacteriology Technical-Series No. 1 and No. 6, Academic Press (1972)
- [27] DE MAN, J.C. MPN tables (corrected), *Eur. J. Appl. Biotechnol.* 1983, 17, pp. 301-5
- [28] COCHRAN, W.G. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". *Biometrics* 1950, 6, pp. 105-16
- [29] HURLEY, M.A. and ROSCOE, M.E. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series, *J. Appl. Bacteriol.* 1983, 55, pp. 159-64
- [30] NIEMELA, S. *Statistical evaluation of results from quantitative microbiological examinations*, Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) Report No. 1, 2nd edition (1983)
- [31] TAYLOR, J. The estimation of numbers of bacteria by tenfold dilution series, *J. Appl. Bacteriol.* 1962, 25, pp. 54-61
- [32] HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. and WILLIAMS, ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th edn., Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1994)

- [33] KRIEG, N.R. and HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology – Volume 1*, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1984)
- [34] SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. and HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology – Volume 2*, 2nd edition, Springer, New York, NY, 2001
- [35] KREGER-VAN RIJ, N.J.W. *The yeasts – A taxonomic study*, 3rd edn., North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Netherlands
- [36] THOMAS, H.A. Bacterial densities from fermentation tube tests, *J. Am. Water Works Assoc.* 1942, 34, pp. 572-6
- [37] ISO/IEC Guide 43-1, *Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1; Development and operation of proficiency testing schemes*
- [38] ISO 6888 (all parts), *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species)*
- [39] ISO 9998, *Water quality – Practices for evaluating and controlling microbiological colony count media used in water quality tests*
- [40] ISO/TR 13843, *Water quality – Guidance on validation of microbiological methods*
- [41] ISO 14461-1, *Milk and milk products – Quality control in microbiological laboratories – Part 1: Analyst performance assessment for colony counts*
- [42] ISO 14461-2, *Milk and milk products – Quality control in microbiological laboratories – Part 2: Determination of the reliability of colony counts of parallel plates and subsequent dilution steps*
- [43] ISO 16654, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Escherichia coli O157*
- [44] ISO/IEC 17025:2005, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*
- [45] EN 12469, *Biotechnology – Performance criteria for microbiological safety cabinets*
- [46] ISO 17604, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Carcass sampling for microbiological analysis*
- [47] ISO 18593, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for sampling techniques from surfaces using contact plates and swab methods*
- [48] ISO Guide 99:1996, *International vocabulary of basic and general terms in metrology*
- [49] ISO/TC 34/SC 9 N852, *Supporting document on the change from two to one plate per dilution for colony-count techniques (revision of ISO 7218)*, June 2007, Marie Comte
- [50] TCVN 4851 (ISO 3696) *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*
- [51] TCVN 7152 (ISO 7712) *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet Pasteur sử dụng một lần*

- [52] BLODGETT R,J, Serial dilution with a confirmation step, *Food Microbiol*, 2005, 22, pp, 547-552
- [53] BLODGETT R,J, Appendix 2: Most PROBABLE number from serial dilutions, In: *Bacterial analytical manual online*, Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration, 2010, Available (viewed 2013-02-04) at: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm>
- [54] GARTHRIGHT W,E,, BLODGETT R,J, FDA's preferred MPN methods for standard, large or unusual tests, with a spreadsheet, *Food Microbiol*, 2003, 20, pp, 439-445
- [55] HALDANE J,B,S, Sampling errors in the determination of bacterial or virus density by the dilution method, *J Hygiene* 1939, 39, pp, 289-293.
- [56] JARVIS B,, WILRICH, C., WILRICH P,T, Reconsideration of the derivation of most probable numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values, *J Appl. Microbiol*, 2010, 109, pp 1660-1667.
- [57] TCVN 7870-2:2010 (ISO 80000-2:2009), *Đại lượng-và đơn vị - Phần 2: Đáu và ký hiệu toán học dùng trong khoa học tự nhiên và công nghệ*.