

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8129 : 2009

ISO 18593 : 2004

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN
CHĂN NUÔI – PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU BÈ MẶT
SỬ DỤNG ĐĨA TIẾP XÚC VÀ LAU BÈ MẶT**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods
for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs*

HÀ NỘI – 2009

Lời nói đầu

TCVN 8129 : 2009 hoàn toàn tương đương với ISO 18593 : 2004;

TCVN 8129 : 2009 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13
Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn
Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp lấy mẫu bề mặt sử dụng đĩa tiếp xúc và lau bề mặt

Microbiology of food and animal feeding stuffs –

Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định các kỹ thuật đối với các phương pháp lấy mẫu bề mặt sử dụng đĩa hoặc gạc tiếp xúc trên bề mặt trong môi trường công nghiệp chế biến thực phẩm (và các nhà máy chế biến thực phẩm), để phát hiện hoặc định lượng vi sinh vật tồn tại.

CHÚ THÍCH Thuật ngữ "môi trường" nghĩa là bất kỳ một vật nào tiếp xúc với sản phẩm thực phẩm hoặc gần như cho thấy nhiễm bẩn hoặc nguồn tái nhiễm, ví dụ: vật liệu, nhà xưởng, người vận hành.

2 Tài liệu viện dẫn

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

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

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

3 Nguyên tắc

3.1 Vì các phương pháp này không xác định được độ tin cậy hoặc tái lập, nên các kết quả chỉ được sử dụng trong "phân tích xu hướng".

3.2 Đĩa tiếp xúc (hoặc phiến kính nhúng) đã làm dày bằng môi trường thạch thích hợp được ấn vào bề mặt cần thử nghiệm. Sau khi ủ, ước tính sự nhiễm bẩn bề mặt thu được bằng cách đếm số lượng khuẩn lạc phát triển.

3.3 Sử dụng phương pháp lau bề mặt, thì đánh dấu vùng bề mặt cần kiểm tra (ví dụ: dùng khuôn mẫu) rồi dùng tăm bông lau vùng đã đánh dấu. Phần tăm bông được bẻ rời cho vào ống nghiệm hoặc chai có chứa dung dịch lỏng vô trùng hoặc chất lỏng trung tính và lắc bằng tay để trộn.

Nếu bề mặt được lau bằng khăn hoặc bọt biển vô trùng (ướt), thì dụng cụ lấy mẫu được bảo quản trong một thể tích xác định của dung dịch lỏng (ví dụ 100 ml cho 100 cm²).

Trong phòng thử nghiệm, sử dụng huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng tháp phân tiếp theo, nếu cần, để xác định số lượng vi sinh vật bằng các qui trình nêu trong các phương pháp định lượng (nhôm) các vi sinh vật cần phát hiện.

CHÚ THÍCH Thời gian và nhiệt độ ủ phụ thuộc vào kiểu vi sinh vật cần phát hiện.

3.4 Đối với môi trường chọn lọc, có thể tiến hành các phép thử khẳng định thích hợp. Số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc của các vi sinh vật cụ thể trên centimet vuông hoặc mỗi miếng gạc tính được từ số lượng khuẩn lạc (đã khẳng định).

3.5 Sau khi lấy mẫu, bề mặt được làm sạch và tẩy trùng, nếu cần, để sau khi lấy mẫu không để lại vết dinh dưỡng trên bề mặt được lấy mẫu.

4 Môi trường nuôi cấy và chất pha loãng

CHÚ THÍCH Để có thêm thông tin, xem các tiêu chuẩn có liên quan về các vi sinh vật đích cần phát hiện hoặc cần định lượng.

4.1 Chất lỏng trung tính

Nhìn chung, thành phần cơ bản đối với chất lỏng trung tính là nước pepton đậm, hoặc muối pepton hoặc bất kỳ chất pha loãng thích hợp nào khác (như dung dịch Ringer nồng độ một phần tư, chất đậm phosphat pH 7,5, dung dịch pepton 1 g/l).

Trường hợp khi có các dư lượng chất khử trùng, thi cần bổ sung các chất trung hoà thích hợp vào dung dịch pha loãng và vào môi trường được sử dụng trên các đĩa tiếp xúc để tránh mọi ảnh hưởng ức chế chất tẩy trùng đến sự phát triển của vi sinh vật.

5 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

Về các yêu cầu chung, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

Có thể dùng dụng cụ sử dụng một lần thay thế cho dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần, nếu có các qui định thích hợp.

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh thông thường và cụ thể như sau:

5.1 Đĩa tiếp xúc, bằng chất dẻo có đường kính 65 mm, được làm đầy một lượng xác định môi trường thạch (chọn theo vi sinh vật đích), đặc biệt là dùng để lấy mẫu bề mặt.

Các đĩa có đường kính hoặc diện tích khác nhau, tùy theo kiểu bề mặt cần lấy mẫu. Thạch phải tạo thành mặt khum trên đĩa.

CHÚ THÍCH Cũng có thể sử dụng bất kỳ dụng cụ nào khác (môi trường dinh dưỡng trong vật chứa cứng hoặc dẻo) mà có thể tiếp xúc với bề mặt cần lấy mẫu, như phiến kính nhúng (5.2).

5.2 Phiến kính nhúng, phiến kính tổng hợp (7 cm^2 đến 10 cm^2), một hoặc hai mặt được phủ một lớp môi trường đặc (được chọn theo các vi sinh vật đích).

CHÚ THÍCH Sẵn có các môi trường phát triển khác nhau theo các vi sinh vật cần tìm.

5.3 Tăm bông có thể bẻ gãy được hoặc **gạc** bằng vật liệu tổng hợp (như algimat hoặc rayon) đựng trong ống hoặc trong bao.

Gạc được khử trùng và được bao gói riêng, bao gói không được chứa các chất ức chế.

CHÚ THÍCH Đối với một số kiểu bề mặt, bông còn sót lại có thể làm nhiễm bẩn các phần bên trong của bề mặt này sau khi lấy mẫu.

5.4 Vải, ẩm ướt, vật liệu đan dệt, không chứa các chất kháng sinh, được đóng gói riêng rẽ trong các bao gói bằng chất dẻo vô trùng, dùng để lấy mẫu các bề mặt lớn ($\geq 100 \text{ cm}^2$).

5.5 Bọt biển, ẩm ướt, phẳng, vuông, không chứa các chất kháng sinh, được đóng gói riêng rẽ trong các bao gói bằng chất dẻo vô trùng, dùng để lấy mẫu các bề mặt lớn ($\geq 100 \text{ cm}^2$).

5.6 Vật chứa, như chai, ống nghiệm hoặc bình cầu, thích hợp để khử trùng và bảo quản môi trường nuôi cấy.

5.7 Hộp làm mát, cách nhiệt, có thể duy trì mẫu ở nhiệt độ thấp trong quá trình vận chuyển đến phòng thử nghiệm.

5.8 Pipet chia độ, có miệng rộng và dung tích danh định 1 ml, được chia các vạch 0,1 ml hoặc pipet tự động có thể phân phối 100 μl và 1000 μl .

5.9 **Bộ trộn**, dùng để trộn các chất lỏng trong các ống nuôi cấy.

5.10 **Bộ đồng hóa kiểu nhu động hoặc bộ đồng hóa được lắc theo phương nằm ngang**, có các túi chất dẻo vô trùng để chuẩn bị huyền phù ban đầu bằng chuyển động xoay (bộ trộn nhu động) hoặc chuyển động rung (bộ đồng hóa được lắc theo phương nằm ngang).

5.11 **Đĩa Petri**, bằng chất dẻo, có đường kính 65 mm.

5.12 **Máy đo pH**, có thể đọc chính xác đến 0,01 đơn vị pH ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, có thể đo chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị pH.

5.13 **Khuôn mẫu**, bằng vật liệu không ăn mòn (ví dụ: khung bằng thép không gỉ đóng khung với diện tích từ 20 đến 100 cm²), dễ dàng làm sạch và có thể khử trùng được.

6 Kỹ thuật lấy mẫu

6.1 Yêu cầu chung

Điều quan trọng là phòng thử nghiệm nhận được đúng mẫu đại diện của bề mặt thử nghiệm và không bị biến đổi trong suốt quá trình vận chuyển và bảo quản, hoặc do dư lượng chất khử trùng.

Các chất tẩy trùng thường được cho thời gian tiếp xúc khử trùng từ 5 min đến 15 min. Thời gian đợi theo qui định của khử trùng trước khi kiểm tra bề mặt bằng đĩa tiếp xúc hoặc gạc để đánh giá hiệu năng làm sạch và chương trình khử trùng (hoặc theo qui định khử trùng).

Không thể qui định một chất trung hòa dùng cho tất cả mọi tình huống. Nhìn chung, sorbitan monooleat (30 g/l) và lexitin (3 g/l) là có thể được dùng để trung hòa các lượng dư của các chất tẩy trùng đã hấp thụ (ví dụ: các hợp chất amoni bậc bốn, amphotericid). Natri thiosulfat (5 g/l) là chất trung hòa tốt đối với các sản phẩm chứa halogen. Trong trường hợp các chất tẩy trùng chứa các peroxit, thì có thể dùng các catalaza hoặc peroxidaza làm chất trung hòa. Một đơn vị của các enzym này xúc tác phân hủy 1 μmol hydro peroxit trong một phút ở 25°C và ở pH $7,0 \pm 0,2$. Một số các chất trung hòa các chất tẩy trùng được khuyến cáo trong EN 1276 [1], EN 1650 [2], EN 13697 [3] và EN 13704 [4].

Các thành phần của chất trung hòa có thể được sử dụng trong hầu hết các tình huống được nêu trong Bảng 1. Thành phần trong dung dịch có pepton (1 g/l) và natri clorua (8,5 g/l), được phân phối vào các ống hoặc chai và được khử trùng 15 min ở 121°C .

Bảng 1 – Chất trung hòa có thể sử dụng trong hầu hết các tình huống

Thành phần	Nồng độ
Sorbitan monooleat (Polysorbat 80)	30 g/l
Lexitin	3 g/l
Natri thiosulfat	5 g/l
L-Histidin	1 g/l
Saponin	30 g/l

6.2 Phương pháp đĩa tiếp xúc

Sau khi lấy ra khỏi hộp vận chuyển, án bè mặt thạch của đĩa tiếp xúc hoặc của phiến kính nhúng thật chặt và không bị dịch chuyển sang các bên của bề mặt thử nghiệm. Theo tài liệu cho biết rằng các kết quả tối ưu đối với các đĩa tiếp xúc thu được với thời gian tiếp xúc 10 s và lực nén có khối lượng 500 g. Đậy các đĩa tiếp xúc hoặc phiến kính ngay sau khi cấy và đặt trở lại vào hộp vận chuyển.

6.3 Phương pháp dùng gạc hoặc vải/bọt biển

6.3.1 Phương pháp dùng gạc

Lấy gạc ra khỏi bao gói vô trùng và làm ẩm đầu mút bằng cách nhúng vào ống nghiệm có chứa dịch pha loãng. Án đầu mút của miếng gạc vào thành ống để bỏ phần nước dư. Đặt đầu mút miếng gạc lên bề mặt cần kiểm tra và vạch trên một vùng rộng 20 cm^2 đến 100 cm^2 , trong khi quay miếng gạc giữa ngón tay trỏ và ngón tay cái theo hai hướng từ các góc phải sang trái.

Bé hoặc cắt que cầm một cách vô trùng và đặt miếng gạc vào ống nghiệm đựng chất lỏng.

6.3.2 Phương pháp dùng bọt biển/vải

Mở túi hoặc hộp bằng chất dẻo đựng miếng vải hoặc miếng bọt biển.

Dùng kẹp vô trùng hoặc mang găng tay vô trùng để lấy miếng vải hoặc bọt biển ra. Làm ẩm bọt biển hoặc miếng vải bằng một lượng vừa đủ của dịch pha loãng. Đối với các bề mặt đã ẩm thì không cần.

Đặt lại miếng vải hoặc miếng bọt biển vào túi đựng bằng chất dẻo và đậy thật kín.

Lấy mẫu bề mặt đã chọn theo hai hướng vuông góc, thay bề mặt của miếng vải hoặc bọt biển. Đặt miếng vải hoặc bọt biển này vào hộp đựng vô trùng, bỏ sung dịch pha loãng và đậy nắp. Thêm một

lượng vừa đủ đã xác định của dịch pha loãng sao cho miếng vải hoặc bọt biển vẫn ẩm cho đến khi phân tích.

Cách khác, mở túi chất dẻo chứa miếng vải hoặc bọt biển. Kẹp chặt miếng bọt biển ở cuối túi, kéo túi ngược theo tay. Dùng miếng bọt biển để lấy mẫu như mô tả ở trên và chuyển miếng vải hoặc bọt biển vào túi chất dẻo vô trùng. Đậy thật kín nắp.

7 Vận chuyển

Vận chuyển mẫu đã lấy được bằng phương pháp dùng gạc, tốt nhất là trong khoảng 4 h để trong hộp lạnh ở 1 °C đến 4 °C. Tiến hành kiểm tra trong phòng thử nghiệm càng sớm càng tốt, không để quá 24 h, như mô tả trong Điều 8.

Chuyển đĩa tiếp xúc và/hoặc phiến kính nhúng, tốt nhất trong khoảng 4 h để tránh nhiễm bẩn.

8 Cách tiến hành

8.1 Phương pháp dùng đĩa tiếp xúc

Ü các đĩa tiếp xúc hoặc phiến kính nhúng tùy theo kiểu loại vi sinh vật cần đếm (xem Chú thích của Điều 4).

Không sử dụng phương pháp dùng đĩa tiếp xúc để phát hiện cụ thể các vi sinh vật gây bệnh.

8.2 Phương pháp dùng gạc

Trộn kỹ lượng chứa trong các ống có chứa gạc, dùng bộ trộn (5.9) trong 30 s, chỉnh tốc độ sao cho thành ống được làm ướt đến khoảng từ 2 cm đến 3 cm tính từ đỉnh ống.

Thêm một lượng dịch pha loãng hoặc chất trung hòa (4.1), tùy thuộc vào diện tích cần kiểm tra (ví dụ: 100 ml cho 100 cm²), vào túi chất dẻo đựng miếng vải hoặc bọt biển. Sau đó xử lý lượng chứa trong túi trong bộ trộn nhu động (5.10) trong 1 min, hoặc bằng bộ trộn lắc ngang (5.10) trong 30 s, để thu được huyền phù ban đầu.

Nếu dự kiến có lượng lớn vi sinh vật thì chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo trong dịch pha loãng nước pepton để thu được số khuẩn lạc có thể đếm được [xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1)].

Tùy theo phương pháp định lượng được sử dụng (xem các tiêu chuẩn tương ứng), lấy huyền phù ban đầu vào các đĩa kép đựng môi trường, sử dụng 1 ml dịch cấy trên mỗi đĩa rót và 0,1 ml dịch cấy cho kỹ thuật dàn đĩa. Xử lý các dung dịch pha loãng tiếp theo theo cùng cách. Lật ngược các đĩa và ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ thích hợp cho từng loại môi trường.

Để thay thế cho phương pháp đĩa nồi trên, có thể sử dụng phương pháp đĩa nhỏ giọt. Bắt đầu với dung dịch pha loãng nhất, dùng pipet vô trùng chuyển các lượng 0,05 ml của các huyền phù ban đầu (gạc, vải hoặc bột biển) và các dung dịch pha loãng tiếp theo sang các phần thích hợp của môi trường cấy đã được đánh dấu trên đáy đĩa thạch (các đĩa kép, sử dụng cùng dung dịch pha loãng đối với các đĩa thạch khác nhau). Mỗi đĩa thạch đã làm khô trước có thể được dùng để nhỏ giọt cho không nhiều hơn sáu dung dịch pha loãng khác nhau. Sử dụng kỹ thuật pipet hút ngược bằng cách ấn hòn pittong xuống khi hút lượng 0,05 ml và cấy vào các đĩa bằng cách ấn pittong chỉ vào điểm dừng thứ nhất. Giữ các đĩa thạch ở tư thế nằm ngang (nắp hướng lên trên) cho đến bì mặt thạch khô.

Nếu sử dụng phương pháp dùng gạc để kiểm tra sự có mặt của các vi sinh vật cụ thể (ví dụ: *Listeria monocytogenes* hoặc *Salmonella* spp.), thì diện tích cần kiểm tra ít nhất phải là 100 cm^2 và tốt nhất là 1000 cm^2 . Chuyển gạc, vải hoặc bột biển vào canh thang tăng sinh thích hợp và trộn kỹ.

8.3 Phát hiện và đếm khuẩn lạc

8.3.1 Phương pháp đĩa tiếp xúc

Đếm số lượng các khuẩn lạc điển hình trên các đĩa tiếp xúc hoặc phiến kính nhưng trực tiếp sau thời gian ủ qui định và khẳng định theo các vi sinh vật cần tìm, nếu cần.

8.3.2 Phương pháp dùng gạc (gồm vải hoặc bột biển)

Đếm số lượng khuẩn lạc điển hình trên mỗi đĩa và khẳng định theo các vi sinh vật cần tìm, nếu cần.

8.3.3 Phương pháp dùng đĩa nhỏ giọt

Đếm số lượng các khuẩn lạc trên mỗi đĩa tại các dung dịch pha loãng cho 5 đến 50 khuẩn lạc.

8.3.4 Qui trình tăng sinh

Sau khi tăng sinh sơ bộ, tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất đối với các vi sinh vật cần tìm.

9 Tính và biểu thị kết quả

CÀNH BÁO – Vì phương pháp dùng đĩa tiếp xúc và phương pháp dùng vải/gạc không cho các kết quả giống nhau, do đó cần phải nêu rõ trong kết quả phương pháp đã sử dụng.

9.1 Phương pháp dùng đĩa tiếp xúc

Chia số lượng các khuẩn lạc đặc trưng cho diện tích bề mặt của đĩa. Ghi lại số đếm là số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên centimet vuông bề mặt.

9.2 Phương pháp dùng gạc (kẻ cà vải và bọt biển)

9.2.1 Tính số đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên mililit huyền phù ban đầu, theo tiêu chuẩn có liên quan.

9.2.2 Tính số đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên centimet vuông bề mặt cần kiểm tra, N_s , theo công thức sau đây:

$$N_s = \frac{N \times F}{A} \times D$$

trong đó

N là số lượng CFU trong 1 ml dung dịch pha loãng (hoặc chất lỏng trung hòa);

F là dung dịch pha loãng (hoặc chất lỏng trung hòa) trong ống hoặc trong túi đồng hóa, tính bằng mililit (ml);

A là bề mặt cần kiểm tra, tính bằng centimet vuông (cm^2);

D là số nghịch đảo của độ pha loãng đã dùng.

9.2.3 Đối với phương pháp đĩa nhỏ giọt, tính số lượng N , CFU trên mililit dung dịch huyền phù, theo công thức sau:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2) \times d}$$

trong đó

$\sum C$ là số lượng khuẩn lạc đếm được trên tất cả các giọt được giữ lại từ hai dung dịch pha loãng liên tiếp, trong đó ít nhất một giọt chứa 5 khuẩn lạc;

V là thể tích chất cấy đã dùng trong mỗi giọt (trong trường hợp này là 50 μl)

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

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

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

Để thu được số đếm trên centimet vuông bề mặt, sử dụng công thức:

$$N_s = \frac{N \times F}{A}$$

trong đó

F là dung dịch pha loãng (hoặc chất lỏng trung hòa) trong ống hoặc trong túi đồng hóa, tính bằng mililit (ml);

A là diện tích đă lau, tính bằng centimet vuông (cm^2).

9.2.4 Nếu không xác định được diện tích đă lau, thi tính số lượng CFU trên mỗi miếng gạc, N_{sw} , theo công thức sau:

$$N_{sw} = N \times F \times D$$

Khi sử dụng các phương pháp bán định lượng, thì các kết quả thu được theo CFU trên centimet vuông bề mặt có thể được gọi là *điểm vệ sinh*. Vì các điểm số này có thể thay đổi nhiều tùy thuộc vào các bề mặt cần kiểm tra, do đó nên cần được các bên quan tâm xác định và đi đến thống nhất.

9.2.5 Trong trường hợp các qui trình tăng sinh, thi báo cáo vi sinh vật đích là phát hiện được hoặc không phát hiện được trong diện tích đă lau, hoặc trên mỗi miếng gạc nếu không biết diện tích.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] EN 1276:1997, *Chemical disinfectants and antiseptics— Quantitative suspension tests for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the food, industrial domestic and institutional areas — Test methods and requirements (phase 2, step 1)*
- [2] EN 1650:1997, *Chemical disinfectants and antiseptics— Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants and antiseptics in food, industrial, domestic, and industrial areas — Test method and requirements (phase 2 step 1)*
- [3] EN 13697:2001, *Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and industrial areas— Test method and requirements without mechanical action (phase 2/step 2)*
- [4] EN 13704:2002. *Chemical disinfectants and antiseptics— Quantitative suspension test for the evaluation of spohcidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and industrial areas — Test and requirements (phase 2. step 1)*
- [5] TCVN 6263 (ISO 8261) *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật*
- [6] TCVN 8128-1: 2009 (ISO/TS 11133-1:2009), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và sản xuất môi trường nuôi cấy – Phần 1: Hướng dẫn chung về đảm bảo chất lượng đối với việc chuẩn bị môi trường nuôi cấy trong phòng thử nghiệm*