

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN VIỆT NAM**

**TCVN 4992 : 2005**

**ISO 7932 : 2004**

Xuất bản lần 2

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN  
CHĂN NUÔI – PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG  
*BACILLUS CEREUS* GIẢ ĐỊNH TRÊN ĐĨA THẠCH –  
KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC Ở 30°C**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus – Colony-count technique at 30 °C*

## Lời giới thiệu

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

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

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

**0.2** Khi có nhiều bào tử xuất hiện, nhưng nếu không phải tất cả thì cũng phải dùng các chủng *B. cereus* mọc sẵn trên bề mặt môi trường cấy được dùng để định lượng. Trong phần lớn các trường hợp dường như không cần xử lý sốc nhiệt để kích thích mọc. Đôi khi cần phải sốc nhiệt, ví dụ như để đếm các bào tử hoặc để ức chế phát triển các tế bào vi khuẩn sinh dưỡng. Trong các trường hợp này, nên xử lý ở 80 °C trong 10 phút.

**Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi –  
Phương pháp định lượng *Bacillus cereus* giả định trên đĩa thạch –  
Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 °C**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus – Colony-count technique at 30°C*

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng *Bacillus cereus* giả định có khả năng mọc được trên đĩa thạch bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 °C. Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho:

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

**CHÚ THÍCH:** Để cho phương pháp thử mang tính thực tiễn thì giai đoạn khẳng định đã giới hạn về thử điển hình trên thạch MYP và thử hồng cầu. Do đó, thuật ngữ “giả định” đã được đưa vào để công nhận thực tế là giai đoạn khẳng định không thể phân biệt được *B.cereus* với các loài *Bacillus* khác có liên quan mật thiết, nhưng thường ít gặp phải như: *B.anthraxis*, *B.thuringiensis*, *B.weihenstephanensis*, *B.mycoides*. Một phép thử tính di động bổ sung có thể giúp để phân biệt *B.cereus* với *B.anthraxis* khi nghi ngờ có mặt *B.anthraxis*.

## 2 Tài liệu viện dẫn

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

TCVN 6507-1 : 2005 (ISO 6887-1 : 1999), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật. Phần 1: Các nguyên tắc chung về chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân.

TCVN 4992 : 2005

ISO 7218 : 1996, Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations and Amd.1 : 2001 (Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn chăn nuôi – Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật).

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

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

#### 3.1

***Bacillus cereus* giả định** (presumptive *Bacillus cereus*)

vi sinh vật hình thành các khuẩn lạc điển hình trên bề mặt của môi trường cấy chọn lọc và cho phản ứng khẳng định dương tính dưới các điều kiện được qui định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Xem Chú thích trong điều 1.

### 4 Nguyên tắc

4.1 Cấy một lượng mẫu thử qui định nếu sản phẩm ban đầu ở dạng lỏng, hoặc một lượng huyền phù ban đầu qui định nếu các sản phẩm ở dạng khác, lên bề mặt môi trường cấy đặc chọn lọc đựng trong các đĩa Petri.

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

4.2 Ủ trong các điều kiện hiếu khí các đĩa ở 30 °C từ 18 h đến 48 h.

4.3 Tính số lượng *B. cereus* trong một mililit hoặc trong một gam mẫu từ số lượng khuẩn lạc khẳng định thu được trên các đĩa ở các độ pha loãng đã chọn sao cho kết quả có ý nghĩa và được khẳng định theo phép thử qui định.

### 5 Dịch pha loãng, môi trường cấy và thuốc thử

Đối với thực hành trong phòng thử nghiệm, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng các loại thuốc thử loại thương mại đã chuẩn bị sẵn.

## 5.1 Dịch pha loãng

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) và tiêu chuẩn riêng liên quan đến sản phẩm cần phân tích.

## 5.2 Môi trường thạch (xem [1])

### 5.2.1 Môi trường cơ bản

#### 5.2.1.1 Thành phần

Cao thịt bò	1,0 g
Pepton từ casein	10,0 g
D-mannitol	10,0 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Phenol đỏ	0,025 g
Thạch	12 g đến 18 g <sup>a</sup>
Nước	900 ml

a Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

#### 5.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước, đun nóng nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH của môi trường hoàn chỉnh (5.2.4) đạt  $7,2 \pm 0,2$  ở  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nếu cần.

Phân phối các lượng 90 ml môi trường vào các bình cầu dung tích thích hợp.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 5.2.2 Dung dịch Polymyxin B

### 5.2.2.1 Thành phần

Polymyxin B sunfat	$10^6$ IU <sup>a)</sup>
Nước	100 ml

<sup>a)</sup> IU là đơn vị quốc tế.

### 5.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan Polymyxin B sunfat trong nước. Lọc để khử trùng.

### 5.2.3 Dung dịch nhũ tương lòng đỏ trứng

Sử dụng các quả trứng gà còn nguyên vẹn. Dùng bàn chải, rửa trứng trong dung dịch tẩy rửa. Tráng sạch dưới dòng nước chảy, ngâm trong etanol 95 % (theo thể tích) trong 30 giây rồi để khô. Bằng kỹ thuật vô trùng, đập vỡ từng quả trứng và tách riêng lòng đỏ bằng cách chuyển lòng đỏ từ nửa vỏ quả này sang nửa vỏ quả còn lại. Cho các lòng đỏ sang ống đong vô trùng và thêm bốn phần theo thể tích nước vô trùng. Chuyển một cách vô trùng sang bình cầu vô trùng và khuấy mạnh.

Đun nóng hỗn hợp 2 h trong nồi cách thuỷ (6.4) để ở 44 °C đến 47 °C. Sau đó để yên 18 h đến 24 h ở 5 °C ± 3 °C để tạo kết tủa.

Bằng cách vô trùng thu lấy nhũ tương phía trên.

Dung dịch nhũ tương này có thể bảo quản đến 72 h ở 5 °C ± 3 °C.

### 5.2.4 Môi trường hoàn chỉnh (thạch MYP)

#### 5.2.4.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.2.1)	90 ml
Dung dịch polymyxin B (5.2.2)	1,0 ml
Dung dịch nhũ tương lòng đỏ trứng (5.2.3)	10,0 ml

#### 5.2.4.2 Chuẩn bị

Làm tan chảy môi trường cơ bản và làm nguội trong nồi cách thuỷ (6.4) để ở 44 °C đến 47 °C.

Cho các dung dịch còn lại vào, trộn kỹ sau mỗi lần thêm.

Làm nguội môi trường hoàn chỉnh trong nồi cách thuỷ (6.4) để ở 44 °C đến 47 °C.

### 5.2.5 Chuẩn bị các đĩa thạch

Rót các phần từ 15 ml đến 20 ml môi trường hoàn chỉnh (5.2.4) sang các đĩa Petri vô trùng (6.6) và để cho đông đặc.

Các đĩa có thể được bảo quản đến 4 ngày ở nhiệt độ 5 °C ± 3 °C trước khi làm khô.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô các đĩa, tốt nhất tháo bỏ nắp ra và úp bề mặt thạch xuống, đặt trong tủ sấy hoặc tủ ấm (6.2) để ở 37 °C đến 55 °C cho đến khi bề mặt thạch khô.

### 5.2.6 Kiểm tra tính năng

Xem ISO/TS 11133-2 : 2003, phụ lục B.

## 5.3 Thạch huyết cừu

### 5.3.1 Môi trường cơ bản: Thạch huyết No.2

#### 5.3.1.1 Thành phần

Pepton proteoza hoặc pepton tương đương	15 g
Sản phẩm thủy phân gan	2,5 g
Cao nấm men	5 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Thạch	từ 12 g đến 18 g <sup>a)</sup>
Nước	1 000 ml

a) Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

#### 5.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là  $7,0 \pm 0,2$  ở 25 °C, nếu cần.

Phân phối vào các bình cầu và khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121 °C.

### 5.3.2 Huyết cừu đã khử sợi huyết

#### 5.3.2.1 Môi trường hoàn chỉnh

##### 5.3.2.1.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.3.1)	100 ml
Huyết cừu đã khử sợi huyết	5 ml đến 7 ml

### 5.3.2.1.2 Chuẩn bị

Sau khi làm nguội đến nhiệt độ từ 44 °C đến 47 °C, bổ sung huyết cừu đã khử sợi huyết vào môi trường cơ bản (5.3.1). Trộn đều.

Rót các phần ít nhất 12 ml môi trường hoàn chỉnh sang các đĩa Petri (6.6) và để cho đông đặc.

## 6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

CHÚ THÍCH: Có thể dùng dụng cụ thủy tinh sử dụng một lần thay thế cho các dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần nếu chúng có các đặc tính thích hợp.

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

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

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

**6.2 Tủ sấy hoặc tủ ấm**, được thông gió đối lưu, để làm khô các đĩa thạch, có khả năng hoạt động ở  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  và  $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**6.3 Tủ ấm**, có thể làm việc ở  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**6.4 Nồi cách thủy**, có thể duy trì nhiệt độ ở 44 °C đến 47 °C.

**6.5 pH met**, có độ chính xác  $\pm 0.1$  đơn vị pH ở 25 °C.

**6.6 Đĩa Petri**, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo có đường kính từ 90 mm đến 100 mm, hoặc 140 mm, nếu cần.

**6.7 Pipet chia vạch**, được hiệu chuẩn chỉ để dùng cho vi khuẩn học, có dung tích danh định 10 ml và 1 ml, được chia vạch 0.5 ml và 0.1 ml tương ứng và có lỗ xả với đường kính danh định từ 2 mm đến 3 mm.

**6.8 Dụng cụ dàn mẫu** (dạng que gạt), que bằng thủy tinh hoặc bằng chất dẻo có đường kính khoảng 3.5 mm và dài 20 cm, một đầu được uốn thành góc vuông với đoạn dài khoảng 3 cm; các đầu được làm nhẵn bằng nhiệt.

## 7 Lấy mẫu

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



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

## 8 Chuẩn bị mẫu thử

Việc chuẩn bị mẫu thử theo tiêu chuẩn riêng phù hợp với các sản phẩm tương ứng.

Nếu chưa có tiêu chuẩn riêng, thì các bên có liên quan tự thoả thuận về vấn đề này.

## 9 Cách tiến hành

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

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) và tiêu chuẩn riêng liên quan tới sản phẩm.

### 9.2 Cấy và ủ

**9.2.1** Lấy hai đĩa thạch (5.2.5), dùng pipet vô trùng (6.7) cho vào mỗi đĩa 0,1 ml mẫu thử nếu sản phẩm ở dạng lỏng hoặc huyền phù ban đầu nếu các sản phẩm ở dạng khác. Lặp lại qui trình với các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo, nếu cần.

**9.2.2** Đối với một số sản phẩm nhất định, tốt nhất để ước tính *B.cereus* với số lượng nhỏ, là tăng các giới hạn phát hiện lên 10 lần bằng cách kiểm tra 1,0 ml mẫu thử nếu sản phẩm ban đầu ở dạng lỏng, hoặc 1,0 ml huyền phù ban đầu nếu sản phẩm ở dạng khác. Phân phối 1 ml dịch cấy lên bề mặt của đĩa Petri lớn (140 mm) hoặc lên khắp bề mặt của ba đĩa nhỏ (90 mm) sử dụng dụng cụ dàn mẫu vô trùng (6.8). Trong cả hai trường hợp, chuẩn bị cho phép xác định kép sử dụng hai đĩa lớn hoặc sáu đĩa nhỏ.

**9.2.3** Cẩn thận dùng que dàn mẫu (6.8) dàn đều dịch cấy trên khắp bề mặt đĩa thạch càng nhanh càng tốt mà không chạm vào các mép đĩa. Sử dụng một que dàn mẫu vô trùng cho mỗi đĩa. Để các đĩa có đầy nắp khoảng 15 phút ở nhiệt độ phòng để chất cấy bám vào thạch.

**9.2.4** Lật úp các đĩa đã chuẩn bị (9.2.3) và để 18 h đến 24 h trong tủ ấm (6.3) ở 30 °C. Nếu không thể nhìn thấy rõ các khuẩn lạc thì ủ các đĩa thêm 24 h trước khi đếm.

### 9.3 Đếm khuẩn lạc

Sau giai đoạn ủ (9.2.4), chọn các đĩa, tốt nhất là ở hai độ pha loãng liên tiếp, có ít hơn 150 khuẩn lạc.

Đếm các khuẩn lạc *B.cereus* giả định trên mỗi đĩa. Các khuẩn lạc giả định là các khuẩn lạc lớn, màu hồng lợt thấy không lên men mannitol, xem chú thích 1) và thường được bao quanh bởi một vùng kết tinh (Hình 1 và 2) (xem chú thích 2).

Nếu có ít hơn 15 khuẩn lạc đặc trưng trên các đĩa được cấy sản phẩm ở dạng lỏng hoặc các sản phẩm ở dạng khác ở độ pha loãng thấp nhất, thì có thể lấy số đếm ước tính như mô tả trong điều 10.

**CHÚ THÍCH 1:** Nếu các đĩa chứa nhiều vi sinh vật lên men mannitol dẫn đến sinh axit, thì màu hồng đặc trưng của khuẩn lạc *B.cereus* có thể bị nhạt đi hoặc biến mất hoàn toàn.

**CHÚ THÍCH 2:** Một số chủng *B.cereus* chỉ sinh ít hoặc không sinh lexitinase. Các khuẩn lạc thuộc các chủng này sẽ không có vùng kết tủa bao quanh. Các khuẩn lạc này cũng cần được thử khẳng định.

Nếu 1,0 ml dịch cấy được dàn trên khắp ba đĩa (xem 9.2.2), thì xử lý các đĩa này như nhau ở các qui trình đếm và khẳng định.

## 9.4 Khẳng định

### 9.4.1 Chọn và lọc khuẩn lạc để khẳng định

Từ mỗi đĩa đã chọn theo 9.3, lấy năm khuẩn lạc giả định. Nếu trên đĩa có ít hơn năm khuẩn lạc, thì lấy tất cả các khuẩn lạc giả định có mặt. Khẳng định các khuẩn lạc này theo qui định trong 9.4.2 và 9.4.3.

Nếu trên các đĩa, khuẩn lạc mọc quá dày và không thể chọn các khuẩn lạc phân lập tốt, thì cấy ria năm khuẩn lạc giả định lên các đĩa đựng môi trường hoàn chỉnh (5.2.4). Để từ 18 h đến 24 h trong tủ ấm (6.3) ở 30 °C.

Chọn trên mỗi đĩa ít nhất một khuẩn lạc có màu hồng phân lập tốt. Khẳng định khuẩn lạc này như qui định trong 9.4.2 và 9.4.3.

### 9.4.2 Thử hồng cầu trên thạch huyết cừu

Cấy ria, cấy đâm sâu hoặc chấm các khuẩn lạc đã chọn (9.4.1) lên mặt thạch huyết cừu (5.3) theo cách sao cho thể hiện được tốt phản ứng hồng cầu.

Ủ ở 30 °C trong 24 h ± 2 h và giải thích phản ứng hồng cầu.

### 9.4.3 Giải thích phản ứng sinh hoá

Xem bảng 1.

**Bảng 1 – Các kết quả thử**

Phép thử	Kết quả khẳng định <i>Bacillus cereus</i> giả định
Thạch MYP (9.4.1)	Hình thành khuẩn lạc màu hồng được bao quanh bởi một vùng kết tủa (xem Chú thích 1 trong 9.3)
Thử hồng cầu (9.4.2)	Phản ứng dương tính <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Phản ứng của vùng hồng cầu, nó có thể thay đổi.

## 10 Biểu thị kết quả

### 10.1 Tính các khuẩn lạc *B. Cereus* giả định

Về cách tính, xem ISO 7218 : 1996 and Amd.1 : 2001.

### 10.2 Không có khuẩn lạc

Nếu có hai đĩa tương ứng của mẫu thử (sản phẩm ở dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm ở dạng khác) không chứa khuẩn lạc *B.cereus* giả định, thì báo cáo kết quả như sau:

- ít hơn 1 vi sinh vật trong một mililit (các sản phẩm ở dạng lỏng);
- ít hơn  $1/d$  vi sinh vật trong một gam (sản phẩm ở dạng khác), trong đó  $d$  là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu.

### 10.3 Độ chụm

#### 10.3.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp đã được ban hành (xem [7] và [8]) và được tóm tắt trong Phụ lục B. Giới hạn độ lặp lại và độ tái lập được xác định sử dụng ba loại thực phẩm bị nhiễm bẩn ở các mức khác nhau và sử dụng các vật liệu chuẩn. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và chất nền khác với loại đã được đưa ra.

#### 10.3.2 Giới hạn lặp lại

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

Như biểu thị chung của giới hạn lặp lại ( $r$ ), các giá trị sau đây có thể được sử dụng khi kiểm tra các mẫu thực phẩm nói chung:

- $r = 0,29$  (được biểu thị theo sự chênh lệch giữa các kết quả thử nghiệm được chuyển thành  $\log_{10}$ ) hoặc
- $r = 2,0$  (được biểu thị theo tỷ số giữa các kết quả thử nghiệm).

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

- 1)  $r = 0,29$  được biểu thị theo sự chênh lệch giữa các kết quả thử nghiệm được chuyển thành  $\log_{10}$  hoặc

VÍ DỤ: Kết quả thử nghiệm thứ nhất là 10 000 hoặc  $1,0 \times 10^4$  *B.cereus* quan sát được trong gam thực phẩm. Dưới các điều kiện lặp lại, thì tỷ số giữa kết quả thử thứ nhất và kết quả thử thứ hai không được quá 2,0. Nên kết quả thử thứ hai phải nằm trong khoảng từ 5 000 (= 10 000/2,0) đến 20 000 (10 000 x 2,0) *B.cereus* trong một gam.

### 10.3.3 Giới hạn tái lập

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

Như biểu thị chung của giới hạn tái lập (*R*), các giá trị sau đây có thể được sử dụng khi kiểm tra các mẫu thực phẩm nói chung:

$R = 0,42$  (được biểu thị theo sự chênh lệch giữa các kết quả thử nghiệm được chuyển thành  $\log_{10}$ ) hoặc

$R = 2,6$  (được biểu thị theo tỷ số giữa các kết quả thử nghiệm).

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

$R = 0,23$  (được biểu thị theo sự chênh lệch giữa các kết quả thử nghiệm được chuyển thành  $\log_{10}$ ) hoặc

$R = 1,7$  (được biểu thị theo tỷ số giữa các kết quả thử nghiệm).

VÍ DỤ 1: Kết quả quan sát được trong thử nghiệm thứ nhất là 10 000 hoặc  $1,0 \times 10^4$  *B.cereus* trong gam thực phẩm. Dưới các điều kiện tái lập, thì tỷ số giữa kết quả thử thu được trong phòng thử nghiệm thứ nhất và phòng thử nghiệm thứ hai không được quá 2,6. Vì vậy, kết quả thử trong phòng thử nghiệm thứ hai phải nằm trong khoảng từ 3 800 (= 10 000/2,6) đến 26 000 (10 000 x 2,6) *B.cereus* trong một gam.

VÍ DỤ 2: Phòng thử nghiệm cần biết mức tối đa có thể thấy rằng nó vẫn còn phù hợp với giới hạn đã định (ví dụ, giới hạn là 100 000 hoặc  $\log_{10}5$ ). Về điều này, giá trị *R* (trên thang log) cần phải nhân với hệ số 0,59. Giá trị 0,25 (0,42 x 0,59) là chênh lệch giữa các kết quả thử nghiệm chuyển sang  $\log_{10}$  hoặc 1,78 ( $10^{0,25}$ ) là tỷ số giữa các kết quả thử nghiệm. Do đó, các kết quả đến  $\log_{10}5,25$  ( $\log_{10}5 + \log_{10}0,25$ ) hoặc 178 000 (100 000 x 1,78) không cho thấy sự không phù hợp với giới hạn. Hệ số 0,59 phản ánh thực tế rằng phép thử có khoảng lệch 95 % được dùng để thử nghiệm cho dù giới hạn đã bị vượt quá. Hệ số 0,59 thu được bằng công thức sau:

$$0,59 = \frac{1,64}{2,6}$$

## 11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử nghiệm đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) nhiệt độ ủ;
- e) mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy ý cũng như các sự cố bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- f) kết quả thử nghiệm thu được, hoặc, nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

**Phụ lục A**

(qui định)

**Giới hạn tin cậy để ước tính các khuẩn lạc với số lượng nhỏ**

Các giới hạn tin cậy ở mức 95 % dùng để ước tính các khuẩn lạc với số lượng nhỏ khi số khuẩn lạc trên các đĩa còn ít hơn 15, được đưa ra trong bảng A.1.

**Bảng A.1**

Số lượng khuẩn lạc	Giới hạn tin cậy ở mức 95 %	
	Giới hạn dưới	Giới hạn trên
1	< 1	2
2	< 1	4
3	< 1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

## Phụ lục B

(tham khảo)

## Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Một phép thử cộng tác quốc tế gồm 20 phòng thử nghiệm của 17 quốc gia tham gia được thực hiện trên phomat, thịt, bột khoai tây và vật liệu chuẩn. Các mẫu thực phẩm mỗi loại được thử nghiệm ở ba mức nhiễm bẩn khác nhau. Phép thử đã được tổ chức vào tháng mười năm 1997 bởi viện Y tế Cộng đồng quốc gia (RIVM) là một phần của dự án Châu âu SMT4 CT-96 2098 do Ủy ban Châu âu tài trợ.

Phương pháp ISO 7932 : 1993 này được gửi đến để thử nghiệm liên phòng, bao gồm các phép thử khẳng định sau: môi trường thạch MYP, môi trường thạch glucoza, môi trường VP và môi trường nitrat.

Các thông số sau đây, phù hợp với TCVN 6910-1 : 2001 (ISO 5725-1 : 1994)<sup>[5]</sup> được dùng để tính toán và cho dữ liệu về độ chụm như trong bảng B.1 đến B.4.

Bảng B.1 – Các kết quả phân tích dữ liệu thu được với các mẫu khoai tây khô

Các thông số	Mẫu (mức nhiễm bẩn)		
	Bột khoai tây khô (mức thấp)	Bột khoai tây khô (mức trung bình)	Bột khoai tây khô (mức cao)
Số lượng mẫu	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	18	18	18
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	0	0	0
Số lượng mẫu được chấp nhận	36	35	36
Giá trị trung bình $\Sigma a$ ( $\log_{10}cfu/g$ )	3,3	4,7	6,1
Độ lệch chuẩn lặp lại $s_r$ ( $\log_{10}cfu/g$ )	0,09	0,05	0,10
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	2,63	1,16	1,60
Giới hạn lặp lại $r$ :			
theo chênh lệch trên thang $\log_{10}$ ( $\log_{10}cfu/g$ )	0,24	0,15	0,27
theo tỷ số trên thang danh định (cfu/g)	1,7	1,4	1,9
Độ lệch chuẩn tái lập $s_R$ ( $\log_{10}cfu/g$ )	0,11	0,09	0,10
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	3,24	1,98	1,71
Giới hạn tái lập $R$ :			
theo chênh lệch trên thang $\log_{10}$ ( $\log_{10}cfu/g$ )	0,30	0,26	0,29
theo tỷ số trên thang danh định (cfu/g)	2,0	1,8	2,0

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

Các thông số	Mẫu (mức nhiễm bẩn)		
	Thịt xay (mức thấp)	Thịt xay (mức trung bình)	Thịt xay (mức cao)
Số lượng mẫu	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	18	18	18
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	0	0	0
Số lượng mẫu được chấp nhận	36	36	36
Giá trị trung bình $\Sigma a$ ( $\log_{10}$ cfu/g)	3,1	3,9	4,9
Độ lệch chuẩn lặp lại $s_r$ ( $\log_{10}$ cfu/g)	0,13	0,14	0,08
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	4,15	3,49	1,56
Giới hạn lặp lại $r$ :			
theo chênh lệch trên thang $\log_{10}$ ( $\log_{10}$ cfu/g)	0,36	0,38	0,21
theo tỷ số trên thang danh định (cfu/g)	2,3	2,4	1,6
Độ lệch chuẩn tái lập $s_R$ ( $\log_{10}$ cfu/g)	0,15	0,14	0,11
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	4,72	3,49	2,30
Giới hạn tái lập $R$ :			
theo chênh lệch trên thang $\log_{10}$ ( $\log_{10}$ cfu/g)	0,41	0,38	0,31
theo tỷ số trên thang danh định (cfu/g)	2,5	2,4	2,1



Bảng B.3 – Các kết quả phân tích số liệu thu được với các mẫu phomat tươi

Các thông số	Mẫu (mức nhiễm bẩn)		
	Phomat tươi (mức thấp)	Phomat tươi (mức trung bình)	Phomat tươi (mức cao)
Số lượng mẫu	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	12	12	12
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	0	0	0
Số lượng mẫu được chấp nhận	23	23	23
Giá trị trung bình $\Sigma a$ ( $\log_{10}$ cfu/g)	3,4	4,1	6,2
Độ lệch chuẩn lặp lại $s_r$ ( $\log_{10}$ cfu/g)	0,05	0,06	0,12
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	1,50	1,57	1,95
Giới hạn lặp lại $r$ :			
theo chênh lệch trên thang $\log_{10}$ ( $\log_{10}$ cfu/g)	0,14	0,18	0,33
theo tỷ số trên thang danh định (cfu/g)	1,4	1,5	2,2
Độ lệch chuẩn tái lập $S_R$ ( $\log_{10}$ cfu/g)	0,08	0,10	0,17
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	2,28	2,38	2,78
Giới hạn tái lập $R$ :			
theo chênh lệch trên thang $\log_{10}$ ( $\log_{10}$ cfu/g)	0,22	0,27	0,48
theo tỷ số trên thang danh định (cfu/g)	1,6	1,9	3,0

**Bảng B.4 – Các kết quả phân tích số liệu thu được với vật liệu chuẩn**

Các thông số	Vật liệu chuẩn
Số lượng mẫu	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	18
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	0
Số lượng mẫu được chấp nhận	36
Giá trị trung bình $\Sigma a$ ( $\log_{10}$ cfu/viên nang)	3,9
Độ lệch chuẩn lặp lại $s_r$ ( $\log_{10}$ cfu/viên nang)	0,04
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	1,12
Giới hạn lặp lại $r$ :	
theo chênh lệch trên thang $\log_{10}$ ( $\log_{10}$ cfu/viên nang)	0,12
theo tỷ số trên thang danh định (cfu/viên nang)	1,3
Độ lệch chuẩn tái lập $S_R$ ( $\log_{10}$ cfu/viên nang)	0,08
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	2,16
Giới hạn tái lập $R$ :	
theo chênh lệch trên thang $\log_{10}$ ( $\log_{10}$ cfu/viên nang)	0,23
theo tỷ số trên thang danh định (cfu/viên nang)	1,7

## Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] MOSSEL, D.A.A., KOOPMAN, M.J and JONGERIUS, E. *Appl. Microbiol.* , **15**, 1967, pp. 650 – 653.
- [2] ICMSF. *Microorganisms in foods*, Vol. 1, 2 nd edn. , University of Toronto Press, 1978.
- [3] COWELL and MORISETTI *J. Sci. Fd. Agric.* , **20**, 1969, p.573.
- [4] INTVELD, P.H. , SOENTORO, P.S.S. and NOTERMANS, S.H.W. I.J. *Food Microbiol.* , **20**, 1993, pp. 23 – 36
- [5] TCVN 6910-1 : 2001 (ISO 5725-1 : 1994) Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.
- [6] TCVN 6910-2 : 2001 (ISO 5725-2 : 1994) Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.
- [7] SCHULTEN S.M., BENSCHOP E., NAGELKERKE N.J.D. and MOOIJMAN K.A. Validation of Microbiological methods: Enumeration of *Clostridium perfringens* according to ISO 7937 (second edition, 1997). Report 286555001, National institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands, 2001.
- [8] SCHULTEN, S.M. , INTVELD P.H. , NAGELKERKE, N.J.D. , SCOTTER, S. , DE BUYSER, M.L. , ROLLIER, P. and LAHELLEC, C.I.J. *Food Microbiology*, **57**, 2000, pp. 53 – 61.
-