

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 4830-2 : 2005

ISO 6888-2 : 1999

WITH AMENDMENT 1 : 2003

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI –
PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG STAPHYLOCOCCI CÓ PHẢN
ỨNG DƯƠNG TÍNH COAGULASE (STAPHYLOCOCCUS
AUREUS VÀ CÁC LOÀI KHÁC) TRÊN ĐĨA THẠCH**

**PHẦN 2: KỸ THUẬT SỬ DỤNG MÔI TRƯỜNG
THẠCH FIBRINOGEN HUYẾT TƯƠNG THỎ**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration
of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species)*

Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium

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 TCVN 4830-1 (ISO 6888-1) và TCVN 4830-2 (ISO 6888-2) mô tả các phương pháp định lượng staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trên đĩa thạch trong đó có thể gặp phải các chủng sinh độc tố. Nó liên quan chủ yếu đến *Staphylococcus aureus*, nhưng cũng có cả *S.intermedius* và các chủng nhất định của *S.hyicus*.

Cả hai tiêu chuẩn TCVN 4830-1 (ISO 6888-1) và TCVN 4830-2 (ISO 6888-2) đều cho các kết quả tương đương. Tuy nhiên, nên sử dụng qui trình mô tả trong TCVN 4830-2 (ISO 6888-2) (xem [1]) đối với các thực phẩm (như pho mát chế biến từ sữa nguyên liệu và các sản phẩm thịt nguyên liệu) bị nhiễm, bản do:

- staphylococci hình thành các khuẩn lạc không điển hình trên môi trường thạch Baird-Parker
- hệ vi khuẩn nền mà có thể che khuất các khuẩn lạc cần tìm.

0.3 Tiêu chuẩn này khẳng định staphylococci dựa trên phản ứng với coagulase dương tính, nhưng phải công nhận rằng một số chủng của *Staphylococcus aureus* cho phản ứng dương tính yếu với coagulase. Các chủng này có thể bị nhầm lẫn với các vi khuẩn khác nhưng chúng có thể được phân biệt bằng cách sử dụng các phép thử bổ sung mà không đề cập đến tiêu chuẩn này như phép thử về độ nhạy với lysostaphin, sinh hemolizin, nucleaze chịu nhiệt và sinh axit từ manitol (xem [1]).

**Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi –
Phương pháp định lượng staphylococci dương tính với coagulase
(*Staphylococcus aureus* và các loài khác) trên đĩa thạch**

Phần 2: Kỹ thuật sử dụng môi trường thạch fibrinogen huyết tương thỏ

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species)

Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trên đĩa thạch có trong các sản phẩm dùng cho con người hoặc thức ăn chăn nuôi, bằng cách tính các khuẩn lạc thu được trên môi trường đặc (môi trường thạch fibrinogen huyết tương thỏ) sau khi ủ trong điều kiện hiếu khí ở 35 °C hoặc 37 °C (xem tài liệu tham khảo [2]).

2 Tài liệu viện dẫn

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

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

TCVN 4830-1 : 2005 (ISO 6888-1 : 1999, with amendment 1 : 2003) Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase (*Staphylococcus aureus* và các loài khác) trên đĩa thạch. Phần 1: Kỹ thuật sử dụng môi trường thạch

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

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase (coagulase-positive staphylococci)

vi khuẩn hình thành khuẩn lạc điển hình trong môi trường thạch chọn lọc fibrinogen huyết tương thỏ khi tiến hành thử nghiệm theo phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

3.2

định lượng staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase (enumeration of the coagulase-positive staphylococci)

việc xác định số lượng staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase có trong một mililit hoặc trong một gam mẫu khi tiến hành thử nghiệm theo phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Chuẩn bị hai đĩa rót môi trường thạch chọn lọc fibrinogen huyết tương thỏ, với một lượng mẫu thử qui định nếu sản phẩm ở dạng lỏng, hoặc với một lượng huyền phù ban đầu qui định nếu sản phẩm ở dạng khác.

Trong cùng một điều kiện, cấy các dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu, dùng hai đĩa cho một độ pha loãng.

4.2 Ủ các đĩa ở 35 °C hoặc 37 °C ¹⁾ trong 18 h đến 24 h, và ủ thêm 24 h, nếu cần.

4.3 Từ số lượng các khuẩn lạc điển hình trên đĩa Petri, tính số lượng staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trong 1 mililit, hoặc trong 1 gam mẫu thử.

5 Dịch pha loãng và môi trường cấy

5.1 Yêu cầu chung

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

¹⁾ Nhiệt độ ủ được chỉ ra bằng dấu ngoặc đơn. Các dấu ngoặc đơn và dấu (điểm đầu) trong dấu ngoặc đơn chỉ mang tính chất tham khảo.

5.2 Dịch pha loãng

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

5.3 Môi trường thạch fibrinogen huyết tương thỏ (xem tài liệu tham khảo [3] và [4]).

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng môi trường bán sẵn phù hợp với yêu cầu của tiêu chuẩn này. Tuy nhiên, cần xem xét các thay đổi về điều kiện thực nghiệm đối với các sản phẩm dạng này, đối với từng lô dung dịch fibrinogen bovin/ huyết tương thỏ nên được thử nghiệm trước khi sử dụng, bằng cách kiểm tra dương tính và âm tính.

5.3.1 Môi trường cơ bản

Chuẩn bị môi trường cơ bản theo 5.3.1 của TCVN 4830-1 : 2005 (ISO 6888-1 : 1999), ngoại trừ việc phân phối môi trường cơ bản từng lượng 90 ml vào bình hoặc lọ.

5.3.2 Dung dịch

5.3.2.1 Dung dịch kali telurit

Chuẩn bị dung dịch dung dịch kali telurit theo 5.3.2.1 của TCVN 4830-1 : 2005 (ISO 6888-1 : 1999).

5.3.2.2 Dung dịch fibrinogen bovin

5.3.2.2.1 Thành phần

Fibrinogen bovin	5 g đến 7 g ¹⁾
Nước vô trùng	100 ml
1) Tùy thuộc vào độ tinh khiết của fibrinogen bovin.	

5.3.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan fibrinogen bovin trong nước ở điều kiện vô trùng ngay trước khi sử dụng.

5.3.2.3 Dung dịch ức chế trypsin và huyết tương thỏ

5.3.2.3.1 Thành phần

Huyết tương thỏ có EDTA dùng cho coagulase (huyết tương coagulase EDTA)	30 ml
Chất ức chế trypsin	30 mg

5.3.2.3.2 Chuẩn bị

Ngay trước khi sử dụng, hoà tan các thành phần trong nước dưới các điều kiện vô trùng.

5.3.3 Môi trường hoàn chỉnh

5.3.3.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.3.1)	90 ml
Dung dịch kali telurit (5.3.2.1)	0,25 ml
Dung dịch fibrinogen bovin (5.3.2.2)	7,5 ml
Dung dịch ức chế tripsin và huyết tương thỏ (5.3.2.3)	2,5 ml

5.3.3.2 Chuẩn bị

Làm tan chảy môi trường cơ bản, sau đó làm nguội trong nồi cách thuỷ (6.3) đến khoảng $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dưới các điều kiện vô trùng, thêm ba dung dịch còn lại đã được làm ấm trước đến $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong nồi cách thuỷ. Trộn kỹ sau mỗi lần thêm bằng cách xoay tròn để hạn chế tối đa việc tạo bọt.

Sử dụng môi trường hoàn chỉnh **ngay sau khi chuẩn bị**, để tránh việc tạo kết tủa của huyết tương.

CẢNH BÁO – Nếu sử dụng dung dịch bovin fibrinogen/ huyết tương thỏ bán sẵn, thì tuân thủ nghiêm ngặt các chỉ dẫn của nhà sản xuất khi chuẩn bị dung dịch này và môi trường hoàn chỉnh (đặc biệt là nhiệt độ của môi trường cơ bản). Ngược lại, có thể làm mất hoàn toàn hoạt tính môi trường.

5.4 Chuẩn bị các đĩa thạch

Xem 5.3.4 của TCVN 4830-1 : 2005 (ISO 6888-1 : 1999).

6 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

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

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

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

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.2 Tủ ấm, để duy trì nhiệt độ của môi trường đã cấy, các đĩa và ống trong dải nhiệt độ $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ hoặc $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.3 Nồi cách thủy, hoặc thiết bị tương tự, có thể duy trì được ở nhiệt độ $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.4 Đĩa Petri, vô trùng, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo.

6.5 Pipet chia độ xả hết, có dung tích danh định 1 ml, 2 ml và 10 ml, được chia vạch 0,1 ml, 0,1 ml và 0,5 ml tương ứng.

7 Lấy mẫu

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

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

8 Chuẩn bị mẫu thử

Việc chuẩn bị mẫu thử theo tiêu chuẩn riêng phù hợp với 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 dịch pha loãng

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

9.2 Cấy và ủ

9.2.1 Lấy 2 đĩa Petri vô trùng (6.4). Dùng pipet vô trùng (6.5) chuyển vào mỗi đĩa 1 ml mẫu thử sản phẩm dạng lỏng, hoặc 0,1 ml huyền phù ban đầu nếu sản phẩm ở dạng khác. Lấy hai đĩa Petri vô trùng khác và chuyển vào mỗi đĩa 1 ml dịch pha loãng thập phân thứ nhất.

Lặp lại trình tự này với các độ pha loãng liên tiếp, sử dụng pipet mới vô trùng đối với mỗi dung dịch pha loãng thập phân.

9.2.2 Rót ngay vào từng đĩa Petri (9.2.1) môi trường hoàn chỉnh vừa chuẩn bị (5.3.3) dày khoảng 3 mm (không giữ môi trường này ở dạng lỏng).

Trộn cẩn thận dịch cấy với môi trường và để cho đông đặc lại bằng cách đặt đĩa Petri lên trên mặt phẳng nằm ngang, mặt

9.2.3 Sau khi đông đặc hoàn toàn, lật ngược các đĩa này và đặt chúng vào tủ ấm (6.2) để ở 35 °C hoặc 37 °C²⁾ từ 18 h đến 24 h. Ủ lại từ 18 h đến 24 h, nếu cần.

9.3 Đếm khuẩn lạc

Sau khi kết thúc giai đoạn ủ (xem 9.2.3), staphylococci hình thành khuẩn lạc nhỏ màu đen hoặc màu xám hoặc thậm chí màu trắng được bao quanh bởi vòng sáng kết tủa dấu hiệu cho hoạt tính coagulase. Khi bắt đầu ủ, các khuẩn lạc *Proteus* có thể cho thấy vẻ bên ngoài giống với các khuẩn lạc staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase. Tuy nhiên, sau khi ủ 24 h hoặc 48 h, chúng có thể phát triển thành khuẩn lạc mọc rộng có màu nâu đậm hoặc nâu nhạt do đó có thể phân biệt được với vi khuẩn staphylococci.

Đếm các khuẩn lạc điển hình trên mỗi đĩa.

CHÚ THÍCH: Vi thạch fibrinogen huyết tương thô được dựa vào phản ứng coagulase, nên không cần thử khả năng định hoạt tính này.

10 Biểu thị kết quả

10.1 Trường hợp chung

Chọn các đĩa chứa tối đa 300 khuẩn lạc, có 100 khuẩn lạc điển hình ở hai độ pha loãng liên tiếp. Mỗi đĩa chứa ít nhất 15 khuẩn lạc điển hình.

Tính số lượng N staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase có trong một mililit hoặc trong một gam sản phẩm là số trung bình của hai độ pha loãng liên tiếp, sử dụng công thức sau:

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

trong đó

$\sum C$ là tổng số các khuẩn lạc staphylococcal điển hình trên tất cả các đĩa đã chọn;

V là thể tích chất cấy trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;

n_1 là số lượng các đĩa đã chọn ở độ pha loãng thứ nhất;

n_2 là số lượng các đĩa đã chọn ở độ pha loãng thứ hai;

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất đã chọn (huyền phù ban đầu là một độ pha loãng);

²⁾ Nhiệt độ được thỏa thuận giữa các bên có liên quan và được nêu trong các báo cáo liên quan.

Làm tròn các kết quả tính được đến hai chữ số có nghĩa [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

Lấy kết quả là số lượng staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong một gam (sản phẩm ở dạng khác), được biểu thị theo số từ 1,0 đến 9,9 nhân 10^x , trong đó x là lũy thừa tương ứng của 10.

VÍ DỤ

Số đếm của sản phẩm sau khi cấy 0,1 ml sản phẩm cho các kết quả sau:

- đối với độ pha loãng thứ nhất đã chọn (10^{-2}): 66 khuẩn lạc điển hình và 54 khuẩn lạc điển hình;
- đối với độ pha loãng thứ hai đã chọn (10^{-3}): 4 khuẩn lạc điển hình và 7 khuẩn lạc điển hình.

$$N = \frac{66 + 54 + 4 + 7}{2,2 \times 10^{-2}} = 5\,955$$

Kết quả sau khi được làm tròn là $6,0 \times 10^3$.

10.2 Ước tính các số lượng nhỏ

10.2.1 Nếu hai đĩa, tương ứng với mẫu thử (nếu các sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (nếu các sản phẩm ở dạng khác), mỗi đĩa chứa ít hơn 15 khuẩn lạc thì báo cáo các kết quả như sau:

a) Đối với các sản phẩm dạng lỏng, số staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase được ước tính trong một mililit:

$$N_e = \frac{C}{2}$$

trong đó: C là tổng số các khuẩn lạc staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase đếm được (9.3) trên hai đĩa đã chọn;

b) Đối với các sản phẩm ở dạng khác, staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase được ước tính trong một gam:

$$N_e = \frac{C}{2xd}$$

trong đó

C là tổng số các khuẩn lạc staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase đếm được (9.3) trên hai đĩa đã chọn;

d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu.

10.2.2 Nếu hai đĩa, tương ứng với mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) không chứa bất kỳ một khuẩn lạc staphylococcal nào có phản ứng dương tính với coagulase, thì báo cáo kết quả như sau:

- ít hơn 1 staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trong 1 millilit (sản phẩm dạng lỏng);
- ít hơn 1/d staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trong một gam (sản phẩm dạng khác), trong đó d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu.

11 Độ chụm

11.1 Yêu cầu chung

Độ chụm của các phương pháp định lượng có thể được biểu thị theo các thuật ngữ về độ lặp lại và độ tái lập, và được định nghĩa trong TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Tuy nhiên phương pháp tính được sử dụng trong TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) dựa vào trung bình không phải bao giờ cũng thích hợp cho các phép phân tích vi sinh vật, mà không phải lúc nào cũng cho sự phân bố chuẩn (Gaussian). Do đó ISO 16140 đã được xây dựng riêng cho các phương pháp phân tích vi sinh vật và trong tiêu chuẩn này sử dụng các bộ ước tính để tính độ lặp lại và độ tái lập. Các phép thống kê này có ưu điểm là ít nhạy đối với các giá trị cực điểm, nên loại trừ được các giá trị ngoại lai bằng các phép thống kê. Do đó các bộ ước tính này được sử dụng trong tiêu chuẩn.

Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được tóm tắt trong phụ lục A. Các giá trị nhận được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và mẫu nền khác với các giá trị đã nêu. Dữ liệu độ chụm được xác định khi sử dụng ba loại thực phẩm đã bị nhiễm ở các mức khác nhau và các vật liệu chuẩn. Các yếu tố như chủng loại cần xem xét, hệ vi sinh vật cạnh tranh, đặc điểm sinh lý của đối tượng và của chủng loại cạnh tranh cũng ảnh hưởng đến giá trị độ chụm.

11.2 Độ lặp lại

11.2.1 Giới hạn về độ lặp lại

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

11.2.2 Các giá trị tổng thể

Để biểu thị chung của giới hạn lặp lại (r), các giá trị sau có thể được sử dụng khi kiểm tra các mẫu thực phẩm nói chung. Các giá trị r này là các giá trị trung bình của tất cả các mẫu được xem xét:

$r = 0,22$ (được biểu thị theo chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả thử nghiệm được chuyển về \log_{10}), hoặc

$r = 1,7$ (được biểu thị theo tỷ số của giá trị cao hơn và giá trị thấp hơn trên thang danh định).

Đối với các vật liệu chuẩn (các viên nang chứa khoảng 5 000 CFU, xem phụ lục A), các giá trị sau đây có thể được sử dụng:

$r = 0,17$ (được biểu thị theo chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả thử nghiệm được chuyển thành \log_{10}), hoặc

$r = 1,5$ (được biểu thị theo tỷ số của giá trị cao hơn và giá trị thấp hơn của hai kết quả thử trên thang danh định).

VÍ DỤ: Kết quả thử nghiệm thứ nhất là 10 000 hoặc $1,0 \times 10^4$ staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase có trong một gam thực phẩm. Dưới các điều kiện lặp lại, tỷ số của giá trị cao hơn và giá trị thấp hơn không được lớn hơn 1,7. Do đó, kết quả thứ hai phải từ 5 882 (= 10 000/1,7) đến 17 000 ($10 000 \times 1,7$) staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trong một gam.

11.3 Độ tái lập

11.3.1 Giới hạn tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả (được chuyển về \log_{10}) của hai phép thử độc lập (số lượng staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trong 1 gam hoặc trong 1 mililit) hoặc tỷ số của giá trị cao hơn và giá trị thấp hơn của hai kết quả thử nghiệm trên thang danh định, thu được khi sử dụng cùng phương pháp trên cùng vật liệu thử nghiệm tiến hành trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do các người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn tái lập (R).

11.3.2 Các giá trị tổng thể

Để 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. Các giá trị R này là các trung trình của tất cả các mẫu.

$R = 0,33$ (được biểu thị theo sự chênh lệch giữa các kết quả thử nghiệm được chuyển thành \log_{10}), hoặc

$R = 2,2$ (được biểu thị theo tỷ số của giá trị cao hơn và giá trị thấp hơn trên thang danh định).

Đối với các vật liệu chuẩn (viên nang chứa khoảng 5 000 CFU, xem phụ lục A) các giá trị sau đây có thể được sử dụng:

$R = 0,21$ (được biểu thị theo sự chênh lệch giữa các kết quả thử nghiệm được chuyển thành \log_{10}), hoặc

TCVN 4830-2 : 2005

$R = 2,0$ (được biểu thị theo tỷ số của giá trị cao hơn và giá trị thấp hơn của hai kết quả thử trên thang danh định).

VÍ DỤ 1: Kết quả thu được trong thử nghiệm thứ nhất là $1,0 \times 10^4$ staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trong một gam sản phẩm thực phẩm. Dưới các điều kiện tái lập, thì tỷ số giữa kết quả thu được trong phòng thử nghiệm thứ nhất và phòng thử nghiệm thứ hai không được lớn hơn 2,2. Do đó, kết quả của phòng thử nghiệm thứ hai phải nằm trong khoảng từ $4,5 \times 10^3 (=1,0 \times 10^4/2,2)$ đến $2,2 \times 10^4 (=1,0 \times 10^4 \times 2,2)$ staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trong một gam.

VÍ DỤ 2: Một phòng thử nghiệm muốn biết mức tối đa để có thể thấy rằng vẫn còn phù hợp với giới hạn đã định (ví dụ giới hạn 10^5 hoặc $\log_{10} 5$). Về điều này, giá trị R (trên thang danh định) cần phải nhân với hệ số 0,59. Giá trị 0,19 ($0,33 \times 0,59$) là chênh lệch giữa các kết quả thử nghiệm chuyển sang \log_{10} hoặc $10^{0,19}$. Do đó, các kết quả đến $\log_{10} 5,19$ ($\log_{10} 5 + \log_{10} 0,19$) hoặc $1,55 \times 10^5$ 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:

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

12 Báo cáo kết quả

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ:

- tất cả thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- nhiệt độ ủ đã sử dụng;
- mọi chi tiết không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc xem như tùy ý lựa chọn, cũng như bất kỳ chi tiết bất thường mà có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- các kết quả thu được.

Phụ lục A

(tham khảo)

Các kết quả của nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm quốc tế được tổ chức bởi Phòng thử nghiệm về Nghiên cứu Chất lượng và Vệ sinh thực phẩm (LERHQA) của cơ quan An toàn thực phẩm Pháp (AFSSA) vào năm 1999 trong khuôn khổ của dự án Châu Âu SMT CT 96 2098 (xem tài liệu tham khảo [7]). Nghiên cứu này gồm có 24 phòng thử nghiệm của 16 nước Châu Âu tham gia và đã tiến hành trên phomat, thịt, bột trứng và các vật liệu chuẩn. Các mẫu thực phẩm mỗi loại được thử nghiệm ở ba mức nhiễm bẩn staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase khác nhau và có kiểm tra âm tính.

Dữ liệu về độ chụm nhận được từ nghiên cứu liên phòng thử nghiệm này để cập đến từng loại mẫu trong bảng từ A.1 đến A.4. Chúng được tính sử dụng kỹ thuật thống kê như mô tả trong ISO 16140. Dữ liệu thu được bởi một số các phòng thử nghiệm đã không đưa vào tính toán khi cho thấy sai lệch khỏi thủ tục nghiên cứu qui định.

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

Mẫu/mức nhiễm bẩn	Pho mát mức thấp	Pho mát mức trung bình	Pho mát mức cao
Số lượng phòng thử nghiệm trả lại kết quả	19	19	19
Số lượng mẫu trong một phòng thử nghiệm	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	18	18	18
Số lượng mẫu được chấp nhận	36	36	36
Giá trị trung bình (\log_{10} CFU/g)	3,25	5,03	6,00
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (\log_{10} CFU/g)	0,09	0,04	0,06
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	2,74	0,88	0,98
Giới hạn lặp lại (r), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} CFU/g)	0,25	0,13	0,17
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (\log_{10} CFU/g)	0,09	0,12	0,11
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	2,94	2,33	1,91
Giới hạn tái lập (R), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} CFU/g)	0,27	0,33	0,32

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

Mẫu/mức nhiễm bẩn	Thịt mức thấp	Thịt mức trung bình	Thịt mức cao
Số lượng phòng thử nghiệm trả lại kết quả	20	20	20
Số lượng mẫu trong một phòng thử nghiệm	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	17	17	17
Số lượng mẫu được chấp nhận	34	34	34
Giá trị trung bình (\log_{10} CFU/g)	3,16	4,13	6,08
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (\log_{10} CFU/g)	0,09	0,07	0,07
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	2,85	1,79	1,22
Giới hạn lặp lại (r), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} CFU/g)	0,25	0,21	0,21
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (\log_{10} CFU/g)	0,11	0,10	0,12
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	3,66	2,38	1,96
Giới hạn tái lập (R), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} CFU/g)	0,32	0,28	0,33

Bảng A.3 – Các kết quả phân tích dữ liệu thu được với các mẫu bột trứng

Mẫu/mức nhiễm bẩn	Bột trứng mức thấp	Bột trứng mức trung bình	Bột trứng mức cao
Số lượng phòng thử nghiệm trả lại kết quả	20	20	20
Số lượng mẫu trong một phòng thử nghiệm	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	19	19	19
Số lượng mẫu được chấp nhận	38	38	38
Gía trị trung bình (\log_{10} CFU/g)	3,25	4,20	5,32
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (\log_{10} CFU/g)	0,12	0,06	0,09
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	3,66	1,41	1,68
Giới hạn lặp lại (r), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} CFU/g)	0,33	0,17	0,25
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (\log_{10} CFU/g)	0,14	0,11	0,14
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	4,20	2,74	2,64
Giới hạn tái lập (R), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} CFU/g)	0,38	0,32	0,39

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

Mẫu/mức nhiễm bẩn	Vật liệu chuẩn (các viên nang chứa khoảng 5 000 CFU)
Số lượng phòng thử nghiệm trả lại kết quả	20
Số lượng mẫu trong một phòng thử nghiệm	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	19
Số lượng mẫu được chấp nhận	38
Giá trị trung bình (\log_{10} CFU/g)	3,85
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (\log_{10} CFU/g)	0,06
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	1,52
Giới hạn lặp lại (r), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} CFU/g)	0,17
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (\log_{10} CFU/g)	0,11
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	2,81
Giới hạn tái lập (R), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} CFU/g)	0,31
a Vật liệu chuẩn được sản xuất bởi RIVM, Netherlands.	

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] KLOOS W.E. Systematic and the natural history of staphylococci. In: Staphylococci, J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. , 69, 1990, pp. 25 s – 37 s; and Bergey's manual of determination bacteriology, 9th edn. , 1994.
- [2] IDF 145 A : 1997, Milk and milk products – Enumeration of coagulase – positive staphylococci staphylococci - Colony-count technique.
- [3] BECKERS H.L. et. , Evaluation of a pour-plate system with rabbit plasma-bovine fibrinogen agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food. Can. J. Microbiol. , 30, 1984. pp. 470-474.
- [4] SAWHNEY D, The toxicity of potassium tellurite to *Staphylococcus aureus* in rabbit plasma fibrinogen agar, *J. Applied Bacteriology*, 61, 1986, pp.149 – 155.
- [5] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) 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.
- [6] ISO 16140, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods.
- [7] DE BUYSER, M.L. , LOMBARD, B., SHULTEN, S.M., IN'T VELD, P.H., SCOTTER, S.L., ROLLIER, R., LAHELLEC, C. Tính hiệu lực của TCVN 4830-1 và TCVN 4830-2. *Int. J. Food Microbiol.*, 83 (2), 2003, pp. 185 – 194.
-