

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 4830-1 : 2005

ISO 6888-1 : 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
ÚNG DƯƠNG TÍNH VỚI COAGULASE (*STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* VÀ CÁC LOÀI KHÁC) TRÊN ĐĨA THẠCH**

**PHẦN 1: KỸ THUẬT SỬ DỤNG MÔI TRƯỜNG
THẠCH BAIRD-PARKER**

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

Part 1: Technique using Baird-Parker 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 cẩn trọng 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 hòa 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 (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 bẩn 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 [2]).

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 Baird-Parker

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

Part 1: Technique using Baird-Parker 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 mặt trong các sản phẩm dùng cho con người hoặc thức ăn chăn nuôi, bằng cách đếm số khuẩn lạc thu được trên môi trường đặc (môi trường Baird-Parker) sau khi ủ trong điều kiện hiếu khí ở 35 °C hoặc 37 °C.

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 6404 (ISO 7218), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn chăn nuôi – Nguyên tắc chung để 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 và/ hoặc không điển hình trên bề mặt của môi trường cấy chọn lọc và cho phản ứng với coagulase dương tính 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 tìm thấy được 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 Cấy lên bề mặt của môi trường cấy đặc chọn lọc, sử dụng hai đĩa, dùng 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 dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu, dùng hai đĩa cho mỗi độ pha loãng.

4.2 Ủ các đĩa trong điều kiện hiếu khí ở 35°C hoặc 37°C ¹⁾ và kiểm tra sau 24 h và 48 h.

4.3 Tính số lượng staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trong một mililit, hoặc trong một gam mẫu từ số lượng khuẩn lạc điển hình và/ hoặc không điển hình trên các đĩa ở các độ pha loãng đã chọn sao cho kết quả có ý nghĩa và được khẳng định bằng kết quả thử coagulase dương tính.

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⁾ Môi trường thử nghiệm giữa các bát có liên quan và được nêu trong báo cáo thử nghiệm.

5.2 Dịch pha loãng

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

5.3 Môi trường thạch Baird-Parker²⁾

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng môi trường bán sẵn, trong trường hợp này phải theo đúng các chỉ dẫn của nhà sản xuất.

5.3.1 Môi trường cơ bản

5.3.1.1 Thành phần

Pepton từ casein	10,0 g
Cao nấm men	1,0 g
Cao thịt	5,0 g
Natri pyruvat	10,0 g
L-Glyxin	12,0 g
Liti clorua	5,0 g
Thạch	12 g đến 22 g ¹⁾
Nước vừa đủ	1 000 ml

1) Phụ thuộc vào sức đông của thạch.

5.3.1.2 Chuẩn bị

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

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

Chuyển các lượng 100 ml môi trường vào các bình hoặc các lọ (6.5) có dung tích thích hợp.

Khử trùng môi trường 15 phút ở 121°C .

5.3.2 Dung dịch

5.3.2.1 Dung dịch kali telurit

5.3.2.1.1 Thành phần

Kali telurit ¹⁾ (K_2TeO_3)	1,0 g
Nước	100 ml

¹⁾ Chỉ sử dụng kali telurit sẵn có phù hợp đối với phép thử này (xem 5.3.2.1.2).

²⁾ Môi trường thạch là môi trường Baird-Parker (xem tài liệu tham khảo [3]) có bổ sung sulfamezathin (xem tài liệu tham khảo [4]) để ngăn ngừa sự co mất của *Proteus*.

5.3.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan hoàn toàn kali telurit trong nước bằng cách đun nóng rất nhẹ.

Bột phải dễ tan. Nếu có mặt chất không hòa tan màu trắng trong nước thì loại bỏ bột đó.

Lọc qua màng lọc cỡ lỗ $0,22 \mu\text{m}$ để khử trùng.

Dung dịch có thể được bảo quản tối đa một tháng ở nhiệt độ $+3^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

Loại bỏ dung dịch, nếu có kết tủa màu trắng.

5.3.2.2 Dung dịch nhũ tương lòng đỏ trứng (nồng độ khoảng 20 % hoặc theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất).

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng dung dịch bán sẵn, nếu có.

Sử dụng trứng gà tươi còn nguyên vẹn. Dùng bàn chải, rửa trứng trong dung dịch tẩy rửa. Tráng sạch dưới dòng nước chảy, sau đó khử trùng vỏ bằng cách ngâm trong etanol (70 % thể tích) trong 30 giây và để cho đến khô trong không khí, hoặc bằng cách phun cồn sau đó tiệt trùng bằng ngọn lửa.

Tiến hành ở điều kiện vô trùng, đập vỡ từng quả trứng và tách lòng đỏ ra khỏi lòng trắng bằng cách chuyển lòng đỏ từ nửa vỏ quả này sang nửa vỏ quả còn lại nhiều lần. Cho lòng đỏ vào trong bình vô trùng (6.5) và thêm bốn phần thể tích nước vô trùng. Trộn kỹ. Đun nóng hỗn hợp này trong nồi cách thủy (6.4) đặt ở nhiệt độ 47°C trong 2 h và để ở nhiệt độ $+3^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ từ 18 h đến 24 h để tạo kết tủa. Tổng điều kiện vô trùng, thu phần chất lỏng nổi phía trên vào bình vô trùng để sử dụng.

Dung nhũ tương này có thể bảo quản ở nhiệt độ $+3^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ tối đa 72 h.

5.3.2.3 Dung dịch sulfamezathin (sulfamethazin, sulfadimidin)

CHÚ THÍCH: Chỉ sử dụng dung dịch này nếu trong mẫu thử nghi ngờ sự có mặt các loài *Proteus*.

5.3.2.3.1 Thành phần

Sulfamezathin	0,2 g
Dung dịch natri hydroxit, c (NaOH) = 0,1 mol/l	10 ml
Nước	90 ml

5.3.2.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan sulfamezathin trong dung dịch natri hydroxit.

Pha loãng bằng nước đến 100 ml.

Dung dịch có thể bảo quản tối đa một tháng ở nhiệt độ $+3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.3.3 Môi trường hoàn chỉnh

5.3.3.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.3.1)	100 ml
Dung dịch kali telurit (5.3.2.1)	1,0 ml
Nhũ tương lòng đỏ trứng (5.3.2.2)	5,0 ml
Dung dịch sulfamezathin (5.3.2.3) (nếu cần)	2,5 ml

5.3.3.2 Chuẩn bị

Làm tan chảy môi trường cơ bản, sau đó làm nguội trong nồi cách thuỷ (6.4) đến khoảng 47°C .

Dưới các điều kiện vô trùng, thêm hai dung dịch khác (5.3.2.1 và 5.3.2.2) và nếu cần (khi nghi ngờ có mặt loài *Proteus* trong mẫu thử) thì thêm dung dịch sulfamezathin (5.3.2.3), mỗi dung dịch khi thêm đều được làm ấm trước trong nồi cách thuỷ ở 47°C , lắc kỹ sau khi thêm từng dung dịch.

5.3.4 Chuẩn bị các đĩa thạch

Đổ một lượng thích hợp môi trường hoàn chỉnh (5.3.3) vào đĩa Petri vô trùng để thu được môi trường thạch dày khoảng 4 mm và để cho đặc lại.

Trước khi làm khô, các đĩa có thể được bảo quản đến 24 h ở nhiệt độ $+3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

CHÚ THÍCH: Đối với các đĩa sản xuất công nghiệp, cần tuân thủ các chỉ dẫn của nhà sản xuất về thời gian bảo quản.

Trước khi sử dụng, làm khô các đĩa, tốt nhất là mở nắp ra và úp bề mặt thạch xuống dưới, đặt vào tủ ấm ở nhiệt độ từ 25°C đến 50°C , cho đến khi các giọt nước biến mất trên bề mặt của môi trường.

5.4 Môi trường canh thang não – tim (Brain-heart infusion broth)

5.4.1 Thành phần

Pepton từ mô tế bào động vật	10,0 g
Bột não bê	12,5 g
Bột tim bò	5,0 g
Glucoza	2,0 g
Natri clorua	5,0 g
Natri hydro phosphat, khan (Na_2HPO_4)	2,5 g
	1.000 ml

5.4.2 Chuẩn bị

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

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,4 \pm 0,2$ ở 25°C .

Chuyển các lượng môi trường cấy từ 5 ml đến 10 ml vào ống hoặc lọ (6.5) có dung tích thích hợp.

Khử trùng môi trường 15 phút ở 121°C .

5.5 Huyết tương thỏ

Sử dụng huyết tương thỏ khô có bán sẵn và hối nước theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Nếu không sẵn có huyết tương thỏ khô, thì pha loãng một thể tích của huyết tương thỏ vô trùng tươi với ba thể tích nước vô trùng.

Nếu kali xitrat hoặc natri xitrat được sử dụng làm chất chống đông vón³⁾ huyết tương, thì thêm dung dịch EDTA (axit etylenediaminetetraaxetic) để có được dung dịch 0,1 % EDTA trong huyết tương đã hối nước hoặc huyết tương đã pha loãng.

Huyết tương đã hối nước hoặc huyết tương đã pha loãng phải được dùng ngay, trừ khi có qui định của nhà sản xuất.

Trước khi sử dụng, kiểm tra từng mẻ huyết tương với các chủng staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase và staphylococci phản ứng âm tính với coagulase.

6 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

CHÚ THÍCH: Có thể dùng dụng cụ thuỷ tinh sử dụng một lần thay thế cho các 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 môi trường đã cấy, các đĩa và ống ở trong dải nhiệt độ $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ hoặc $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

³⁾ Đối với huyết tương đã oxalat hóa hoặc hexamin hóa, tự không cần đến EDTA. Xem 3

6.3 Tủ sấy hoặc tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ từ $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ đến $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.4 Nồi cách thuỷ, hoặc thiết bị tương tự, có thể duy trì được nhiệt độ ở $47^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

6.5 Ống nghiệm, bình hoặc lọ có nắp vặn, có dung tích thích hợp để khử trùng, bảo quản môi trường cấy và ủ môi trường dạng lỏng; đặc biệt, các ống đựng dung dịch hồng cầu vô trùng, hoặc các lọ đáy tròn có kích thước khoảng 10 mm x 75 mm.

6.6 Đĩa Petri, vô trùng, bằng thuỷ tinh hoặc chất dẻo.

6.7 Que cây thẳng [xem TCVN 6404 (ISO 7218) và pipet Pasteur].

6.8 Pipet chia độ xả hết, có dung tích danh định 1 ml, 2 ml và 10 ml, được chia vạch tương ứng $0,1\text{ ml}$, $0,1\text{ ml}$ và $0,5\text{ ml}$.

6.9 Dụng cụ dàn mẫu, vô trùng, bằng thuỷ tinh hoặc chất dẻo.

6.10 pH mét, có thể đọc chính xác đến 0,01 đơn vị pH ở 25°C , có thể đo chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị pH.

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 thỏa 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 các sản phẩm tương ứng. Nếu chưa có tiêu chuẩn riêng, thì các bên có liên quan tự thỏa 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 phù hợp với sản phẩm liên quan.

9.2 Cây

9.2.1 Dùng pipet vô trùng (6.8) chuyển vào hai đĩa thạch (5.3.4) mỗi đĩa $0,1\text{ ml}$ mẫu thử nếu sản phẩm ở dạng lỏng, hoặc $0,1\text{ ml}$ huyền phù ban đầu (độ pha loãng 10^{-1}) nếu sản phẩm ở dạng khác. Lặp lại 1-2 lần, hay đổi với độ pha loãng 10^{-2} và các độ pha loãng thập phân tiếp theo nếu cần.

9.2.2 Đối với các sản phẩm nhất định, tốt nhất để đếm staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase với số lượng thấp, thì các giới hạn phát hiện có thể tăng lên 10 lần bằng cách cấy 1,0 ml mẫu thử dạng lỏng, hoặc 1,0 ml huyền phù ban đầu nếu các sản phẩm ở dạng khác, lên bề mặt của một đĩa thạch lớn (140 mm) hoặc lên bề mặt của ba đĩa thạch nhỏ (90 mm). Trong cả hai trường hợp, chuẩn bị mẫu kép bằng cách dùng hai đĩa to hoặc sáu đĩa nhỏ.

9.2.3 Sử dụng dụng cụ dàn mẫu (6.9) dàn chất cấy cẩn thận càng nhanh càng tốt, lên mặt đĩa thạch, cố gắng không chạm vào mép đĩa. Để các đĩa có nắp đậy cho đến khô trong khoảng 15 phút ở nhiệt độ phòng thử nghiệm.

9.3 Ủ

Lật ngược các đĩa đã được chuẩn bị theo 9.2.3 và ủ chúng trong $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ sau đó ủ lại thêm $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ trong tủ ấm (6.2) ở 35°C hoặc 37°C ⁴⁾.

9.4 Chuẩn bị các đĩa và diễn giải

9.4.1 Sau khi ủ $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$, đánh dấu vị trí của các khuẩn lạc điển hình có mặt (xem chú thích 1) dưới đáy của các đĩa.

Ủ lại tất cả các đĩa ở nhiệt độ 35°C hoặc 37°C ⁴⁾ thêm $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$, và đánh dấu các khuẩn lạc điển hình mới. Đồng thời cũng đánh dấu cả các khuẩn lạc không điển hình có mặt (xem chú thích 1).

Chỉ lấy các đĩa (xem chú thích 2) có chứa tối đa 300 khuẩn lạc với 150 khuẩn lạc điển hình và/ hoặc không điển hình ở hai dung dịch kế tiếp nhau để định lượng. Một trong các đĩa phải chứa ít nhất 15 khuẩn lạc. Chọn để khẳng định (9.5) lượng A đã có (thường 5 khuẩn lạc điển hình nếu chỉ có khuẩn lạc điển hình, hoặc 5 khuẩn lạc không điển hình nếu chỉ có khuẩn lạc không điển hình, hoặc 5 khuẩn lạc điển hình và 5 khuẩn lạc không điển hình nếu cả hai loại đều có mặt ở mỗi đĩa).

Với sản phẩm dạng lỏng chưa pha loãng hoặc dung dịch pha loãng thấp nhất của các sản phẩm dạng khác, nếu có ít hơn 15 khuẩn lạc điển hình và/ hoặc không điển hình có mặt trên các đĩa, có thể ước tính như mô tả trong 9.4.3 và 10.2.

CHÚ THÍCH 1: Các khuẩn lạc điển hình có màu đen hoặc màu xám, bóng và lồi (có đường kính từ 1 mm đến 1,5 mm sau khi ủ trong 24 h, và từ 1,5 mm đến 2,5 mm sau khi ủ 48 h) và được bao quanh bởi một vùng trung rõ rệt, cũng có thể là mờ từng phần. Sau khi ủ trong ít nhất 24 h, có thể xuất hiện một vòng màu trắng đúc tiếp giáp với khuẩn lạc.

⁴⁾ Nhiệt độ này được các bên có liên quan thoả thuận và được nêu rõ trong oao cáo thử nghiệm.

CHÚ THÍCH 2: Các khuẩn lạc không điển hình cùng kích cỡ như khuẩn lạc điển hình và có thể có một trong các hình thái sau:

- các khuẩn lạc đen bóng có hoặc không có viền trắng hẹp; không có vùng trong hoặc hầu như không nhìn thấy và không có vòng trắng đục hoặc rất khó nhìn thấy.
- các khuẩn lạc màu xám không có vùng trong.

Các khuẩn lạc không điển hình được hình thành chủ yếu bởi các chủng staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase bị nhiễm bẩn trong các sản phẩm, ví dụ, các sản phẩm sữa, tôm và các bộ phận của vật nuôi. Chúng thường ít khi được hình thành bởi nhiễm các chủng staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase bị nhiễm bẩn trong các sản phẩm khác.

CHÚ THÍCH 3: Các khuẩn lạc khác là tất cả các khuẩn lạc còn lại có khả năng có mặt trên các đĩa mà không cho thấy biểu hiện bên ngoài điển hình hoặc không điển hình như đã mô tả trong Chú thích 1 và Chú thích 2, và được coi là hệ vi khuẩn nền.

9.4.2 Nếu dàn 1,0 ml chất cấy lên ba đĩa (xem 9.2.2), thì xử lý các đĩa này giống nhau theo các qui trình đếm và khẳng định.

9.4.3 Để ước tính số lượng nhỏ staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase, thì giữ lại tất cả các đĩa có chứa khuẩn lạc điển hình và không điển hình. Chọn tất cả các khuẩn lạc để khẳng định nằm trong giới hạn đề ra ở trên.

9.5 Khẳng định (phép thử coagulase)

Từ mỗi khuẩn lạc đã chọn (9.4), dùng que cấy vô trùng (6.7) lấy một phần và chuyển vào ống hoặc lọ đựng môi trường canh thang não – tim (5.4).

Ủ ở 35°C hoặc 37°C ⁵⁾ trong 24 ± 2 h.

Bằng kỹ thuật vô trùng, lấy 0,1 ml mỗi dịch cấy cho vào 0,3 ml huyết tương thỏ (5.5) (trừ khi nhà sản xuất qui định các lượng khác) đựng trong các ống hoặc lọ đựng dung dịch hồng cầu vô trùng (qui định trong 6.5), và ủ ở nhiệt độ 35°C hoặc 37°C ⁵⁾.

Nghiêng ống, kiểm tra sự kết dính của huyết tương sau khi ủ từ 4 h đến 6 h và nếu phép thử là âm tính, thì kiểm tra lại sau khi ủ 24 h, hoặc kiểm tra theo thời gian ủ được nhà sản xuất qui định.

Nếu thể tích kết dính chiếm hơn một nửa thể tích ban đầu của chất lỏng, thì phép thử coagulase là dương tính.

Để kiểm tra âm tính, đối với mỗi mẻ huyết tương, thêm 0,1 ml môi trường canh thang não-tim vô trùng (5.4) vào một lượng huyết tương thô (5.5) đã khuyến cáo và ủ nhưng không cấy. Phép thử hợp lệ khi kiểm tra huyết tương cho thấy không có dấu hiệu kết dính.

10 Biểu thị kết quả

10.1 Trường hợp chung

10.1.1 Tính số lượng a của staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase đã nhận dạng trên mỗi đĩa đã chọn

Trên mỗi đĩa, tính số lượng a các staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase đã được nhận dạng, theo công thức:

$$a = \frac{b_c}{A_c} \times c_c + \frac{b_{nc}}{A_{nc}} \times c_{nc}$$

trong đó

A_c là số lượng khuẩn lạc điển hình đã qua phép thử coagulase (9.5);

A_{nc} là số lượng khuẩn lạc không điển hình đã qua phép thử coagulase (9.5);

b_c là số lượng khuẩn lạc điển hình cho thấy có phản ứng dương tính với coagulase;

b_{nc} là số lượng khuẩn lạc không điển hình cho thấy có phản ứng dương tính với coagulase;

c_c là tổng số khuẩn lạc điển hình nhìn thấy trên đĩa (9.4);

c_{nc} là tổng số khuẩn lạc không điển hình nhìn thấy trên đĩa (9.4);

Lấy kết quả tròn số [Xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

10.1.2 Tính số lượng N staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase đã được nhận dạng có mặt trong phần mẫu thử

Đối với các đĩa có chứa tối đa 300 khuẩn lạc, có 150 khuẩn lạc điển hình và/ hoặc không điển hình ở hai độ pha loãng liên tiếp, thì tính số lượng Staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase đối với mỗi đĩa theo qui định trong 10.1.1 và tính số N Staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase được nhận biết có mặt trong mẫu thử, là trung bình thu được từ hai độ pha loãng liên tiếp, bằng công thức sau:

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

trong đó

- Σa là tổng số khuẩn lạc staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase đã nhận biết trên tất cả các đĩa đã chọn.
- V là thể tích của chất cấy trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;
- n_1 là số đĩa đã được chọn ở độ pha loãng thứ nhất;
- n_2 là số đĩa đã được chọn ở độ pha loãng thứ hai;
- d là độ pha loãng tương ứng với dung dịch pha loãng thứ nhất đã chọn (huyền phù ban đầu là một độ pha loãng).

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

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

10.1.3 Ví dụ

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

- đối với độ pha loãng thứ nhất đã chọn (10^{-2}): 65 khuẩn lạc điển hình, 85 khuẩn lạc điển hình và không có khuẩn lạc không điển hình;
- đối với độ pha loãng thứ hai đã chọn (10^{-3}): 3 khuẩn lạc điển hình, 7 khuẩn lạc điển hình và không có khuẩn lạc không điển hình.

Số lượng được cấy đậm sâu như sau:

- từ 65 khuẩn lạc, 5 khuẩn lạc được cấy đậm sâu và cả 5 khuẩn lạc đã cho phản ứng dương tính với coagulase, nên $a = 65$.
- từ 85 khuẩn lạc, 5 khuẩn lạc được cấy đậm sâu, 3 trong số đó đã cho phản ứng dương tính với coagulase, nên $a = 51$.
- từ 3 khuẩn lạc, tất cả 3 khuẩn lạc được cấy đậm sâu và đã cho phản ứng dương tính với coagulase, nên $a = 3$.
- từ 7 khuẩn lạc, 5 khuẩn lạc được cấy đậm sâu và cả 5 đã cho phản ứng dương tính với coagulase, nên $a = 7$.

$$N = \frac{65 + 51 + 3 + 7}{0,22 \times 10^{-2}} = 57\,272$$

10.2 Ước tính các số lượng nhỏ

10.2.1 Nếu hai đĩa, tương ứng với mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm ở dạng khác), mỗi đĩa chứa ít hơn 15 khuẩn lạc đã được nhận biết 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 (10.1.1) trong một mililit được ước tính như sau:

$$N_e = \frac{\sum a}{V \times 2}$$

trong đó

$\sum a$ là tổng số khuẩn lạc staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase nhận biết được (10.1.1) trên hai đĩa đã chọn;

V là thể tích cấy lên mỗi đĩa.

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

$$N_e = \frac{\sum a}{V \times 2 \times d}$$

trong đó

$\sum a$ là tổng số khuẩn lạc staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase nhận biết được (10.1.1) trên hai đĩa đã chọn;

d là độ pha loãng của huyền phù ban đầu;

V là thể tích cấy lên mỗi đĩa.

10.2.2 Nếu hai đĩa tương ứng khi cấy 0,1 ml (trường hợp chung là 0,1 ml dịch cấy) mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) không chứa bất kỳ khuẩn lạc staphylococci nào có phản ứng dương tính với coagulase, thì báo cáo kết quả như sau :

- ít hơn 10 staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng);
- ít hơn 10/d staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trong một gam (sản phẩm dạng khác), trong đó d là độ pha loãng của huyền phù ban đầu.

Nếu cấy 1 ml mẫu, thì báo cáo kết quả như sau:

- ít hơn 1 staphylococcus có phản ứng dương tính với coagulase trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng);
- ít hơn 1/d staphylococcus có phản ứng dương tính với coagulase trong một gam (sản phẩm dạng khác).

11 Độ chum

11.1 Yêu cầu chung

Độ chum 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 chum 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 tập trung các mẫu khác với các giá trị đã nêu. Dữ liệu độ chum 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 chum.

11.2 Độ lặp lại

11.2.1 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 staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trong một gam hoặc trong 1 mililit) hoặc tỷ số giữa 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 vật liệu thử giống hệt nhau trong cùng một phòng thử nghiệm, do một người thao tác, sử dụng cùng thiết bị, thực hiện 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 độ 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 là các giá trị trung bình của tất cả các mẫu được xem xét:

$$r = 0,28 \text{ (được biểu thị theo chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả thử nghiệm được chuyển thành } \log_{10} \text{), hoặc}$$

$$r = 1,9 \text{ (được biểu thị theo tỷ số của giá trị cao hơn và giá trị thấp hơn của hai kết quả thử nghiệm trên thang danh định).}$$

Đối với 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:

$r = 0,19$ (được biểu thị theo chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả thử nghiệm được chuyển về \log_{10}), hoặc

$r = 1,55$ (được biểu thị theo tỷ số của giá trị cao hơn và giá trị thấp hơn của hai kết quả thử nghiệm 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 quan sát được trong một gam thực thẩm. Dưới các điều kiện lặp lại, tỷ số của giá trị cao hơn và giá trị thấp hơn của hai kết quả thử không được lớn hơn 1,9. Vì vậy, kết quả thứ hai phải từ 5 263 ($= 10 000 / 1,9$) đến 19 000 ($10 000 \times 1,9$) 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, 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 bình của tất cả các mẫu.

$R = 0,43$ (được biểu thị theo sự chênh lệch giữa các kết quả thử nghiệm được chuyển thành \log_{10}), hoặc

$R = 2,7$ (được biểu thị theo tỷ số của giá trị cao hơn và giá trị thấp hơn của hai kết quả thử nghiệm 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:

$R = 0,39$ (được biểu thị theo sự chênh lệch giữa các kết quả thử nghiệm được chuyển thành \log_{10}), hoặc

$R = 2,4$ (được biểu thị theo tỷ số của giá trị cao hơn và giá trị thấp hơn trên thang danh định).

VÍ DỤ 1: Kết quả quan sát được trong phòng thử nghiệm thứ nhất là $1,0 \times 10^4$ staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trong 1 gam sản phẩm thực phẩm. Dưới các điều kiện tái lặp, thì tỷ số giữa kết quả thu được trong phòng thử nghiệm thứ nhất và phòng thử nghiệm thứ hai không được lớn hơn 2,7. Vì vậy, kết quả của phòng thử nghiệm thứ hai phải nằm trong khoảng từ $3,7 \times 10^3$ ($=1,0 \times 10^4/2,7$) đến $2,7 \times 10^4$ ($=1,0 \times 10^4 \times 2,7$) staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trong 1 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 0,25 ($0,43 \times 0,59$) là chênh lệch giữa các kết quả thử nghiệm chuyển sang \log_{10} hoặc $10^{0,25}$ 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 $1,8 \times 10^5$ 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 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 thử nghiệm

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 tuỳ 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 [8]). Nghiên cứu này gồm có 24 phòng thử nghiệm của 16 nước Châu Âu tham gia và đã tiến hành trên phomát, thịt, bột trứng và các vật liệu chuẩn. Các mẫu thực phẩm mỗi loại được thử nghiệm ở ba mức nhiễm bẩn *Staphylococcus* 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 toán sử dụng kỹ thuật thống kê như mô tả trong ISO 16140. Dữ liệu thu được bởi một số 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 phomát

Mẫu/mức nhiễm bẩn	Phomát mức thấp	Phomát mức trung bình	Phomát mức cao
Số lượng phòng thử nghiệm trả lại kết quả	22	22	22
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
Giá trị trung bình (\log_{10} CFU/g)	3,33	5,12	6,06
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_l (\log_{10} CFU/g)	0,18	0,06	0,12
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	5,36	1,16	1,96
Giới hạn lặp lại (r), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (cfu/g)	0,50	0,17	0,33
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (\log_{10} CFU/g)	0,19	0,16	0,24
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	5,61	3,24	3,91
Giới hạn tái lập (R), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (CFU/g)	0,52	0,47	0,66

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	23	23	23
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
Gía trị trung bình (\log_{10} CFU/g)	3,27	4,20	6,19
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (\log_{10} CFU/g)	0,12	0,07	0,10
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	3,64	1,58	1,67
Giới hạn lặp lại (r), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} CFU/g)	0,33	0,19	0,29
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (\log_{10} cfu/g)	0,17	0,17	0,14
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	5,25	3,99	2,26
Giới hạn tái lập (R), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} CFU/g)	0,48	0,47	0,39

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	23	23	23
Số lượng mẫu trong một phòng thử nghiệm	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	20	20	20
Số lượng mẫu được chấp nhận	40	40	40
Gia trị trung bình (\log_{10} CFU/g)	3,17	4,10	5,23
Độ lệch chuẩn lặp lại, s , (\log_{10} CFU/g)	0,09	0,09	0,07
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	2,78	2,17	1,41
Giới hạn lặp lại (r), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} CFU/g)	0,25	0,25	0,21
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (\log_{10} CFU/g)	0,11	0,10	0,11
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	3,57	2,55	2,08
Giới hạn tái lập (R), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} CFU/g)	0,32	0,29	0,30

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

Mẫu/mức nhiễm bẩn	Vật liệu chuẩn ^a (các viên nang chứa khoảng 5 000 CFU)
Số lượng phòng thử nghiệm trả lại kết quả	23
Số lượng mẫu trong một phòng thử nghiệm	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	20
Số lượng mẫu được chấp nhận	40
Giá trị trung bình (\log_{10} CFU/g)	3,79
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (\log_{10} CFU/g)	0,07
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (%)	1,76
Giới hạn lặp lại (r), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} CFU/g)	0,19
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (\log_{10} CFU/g)	0,14
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (%)	3,68
Giới hạn tái lập (R), theo chênh lệch trên thang \log_{10} (\log_{10} CFU/g)	0,39

^a Vật liệu chuẩn do RIVM của Netherlands chuẩn bị.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 4830-2 (ISO 6888-2) Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase (Staphylococcus aureus và loài khác) trên đĩa thạch. Phần 2: Kỹ thuật sử dụng môi trường thạch fibrinogen huyết tương thỏ.
- [2] KLOOS W.E, Systematics and the natural history of staphylococci. In: *Staphylococci*, J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl., 69, 1990. 25 s – 37 s; and Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edn., 1994.
- [3] BAIRD – PARKER, A.C. J Appl. Bacteriol., 25 (1), 1962, pp. 12 – 19.
- [4] SMITH, B.A. and BAIRD – PACKER, A.C.J. Appl. Bacteriol., 27 (1), 1964, pp. 78-82.
- [5] BAIRD – PACKER, A.C. *The Staphylococci*, (ed. Cohen, J.O.), Wiley – Interscience, New York, London, 1972, p.11.
- [6] 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.
- [7] ISO 16140. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods.
- [8] DE BUYSER, M.L., LOMBARD., SHULTEN, S.M., IN'T VELD, P.H., SCOTTER, S.L., ROLLIER, R., LAHELLEC, C. Tính hiệu lực của TCVN 4830-1 : 2005 (ISO 6888-1 : 1999 with amendment 1: 2003) và TCVN 4830-2 . 2005 (ISO 6888-2 : 1999 with amendment 1 : 2003) Định lượng Staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase trong thực phẩm. *Int. J. Food Microbiol.*, 83 (2), 2003, pp.185-194.