



TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13875:2023

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG CHUỖI THỰC PHẨM –  
ĐỊNH LƯỢNG NHANH *ESCHERICHIA COLI* VÀ COLIFORM  
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG ĐĨA COMPACT DRY EC**

*Microbiology of the food chain –  
Rapid enumeration of Escherichia coli and coliforms by the method  
using Compact Dry EC*

HÀ NỘI – 2023



## **Lời nói đầu**

TCVN 13875:2023 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Viện Tiêu chuẩn Chất lượng Việt Nam đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.



## Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Định lượng nhanh *Escherichia coli* và coliform bằng phương pháp sử dụng đĩa Compact Dry EC

*Microbiology of the food chain – Rapid enumeration of Escherichia coli  
and coliforms by the method using Compact Dry EC*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sử dụng đĩa Compact Dry EC để định lượng nhanh <sup>1)</sup> *Escherichia coli* (ngoại trừ chủng *E. coli* O157) và tổng số coliform trong thực phẩm.

Phụ lục A cung cấp thông tin về kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp và kết quả của các phép thử liên phòng thử nghiệm do các tổ chức AOAC <sup>[9],[13],[14]</sup>, NMKL - NordVal <sup>[11]</sup> và Microval <sup>[12]</sup> thực hiện.

### 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 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần), *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*

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

---

<sup>1)</sup> Phương pháp này cho phép bỏ qua bước khẳng định như trong các phương pháp chuẩn nêu trong TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2007)<sup>[3]</sup> và AOAC 966.24<sup>[8]</sup>.

### 3.1

#### ***Escherichia coli***

##### *E. coli*

Vi khuẩn ở nhiệt độ 37 °C hình thành các khuẩn lạc điển hình có màu xanh lam hoặc xanh tím trên môi trường với các điều kiện được quy định trong tiêu chuẩn này

### 3.2

#### **Coliform (coliforms)**

Vi khuẩn ở nhiệt độ 37 °C hình thành các khuẩn lạc điển hình có màu xanh lam, xanh tím, hồng hoặc đỏ trên môi trường với các điều kiện được quy định trong tiêu chuẩn này

### 3.3

#### **Khuẩn lạc (colony)**

Cụm sinh khối vi sinh vật tại một vị trí, có thể nhìn thấy, phát triển trên hoặc trong môi trường dinh dưỡng đặc từ một phần tử sống

## 4 Nguyên tắc

Sử dụng đĩa môi trường chuẩn bị sẵn bao gồm môi trường nuôi cấy, chất tạo gel và hai cơ chất enzym tạo màu. Đĩa chứa môi trường được làm ấm bằng phần mẫu thử đã chuẩn bị, sau đó chất tạo gel sẽ làm môi trường hóa rắn. Ủ môi trường chứa phần mẫu thử ở nhiệt độ 37 °C ± 1 °C trong thời gian 24 h ± 2 h. *E. coli* hình thành các khuẩn lạc màu xanh lam hoặc xanh tím và các vi khuẩn coliform khác với *E. coli* hình thành các khuẩn lạc màu đỏ hoặc hồng.

CHÚ THÍCH 1: Các vi khuẩn không phải coliform bị ức chế và sẽ không hình thành các khuẩn lạc màu xanh lam, xanh tím, hồng hoặc đỏ điển hình.

CHÚ THÍCH 2: *E. coli* O157 không sinh beta-glucuronidase nên không được phát hiện là *E. coli* trên đĩa Compact Dry EC. *E. coli* O157 hình thành khuẩn lạc màu đỏ hoặc hồng trên đĩa Compact Dry EC.

## 5 Môi trường nuôi cấy và dung dịch pha loãng

Chỉ sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích, nước sử dụng là nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

### 5.1 Đĩa Compact Dry EC

Đĩa Compact Dry EC gồm hỗn hợp các chất dinh dưỡng (pepton, kali nitrat, natri clorua và natri pyruvat), đệm phosphat, các chất chọn lọc đối với vi khuẩn Gram dương, chất tạo gel (polysaccharid có nguồn gốc từ thạch) và hai cơ chất enzym tạo màu là 5-bromo-6-chloro-3-indoxyl-beta-D galactopyranoside (Magenta-GAL) và muối cyclohexylamoni của axit 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-glucuronic (X-Gluc).

Kích thước của đĩa là 20 cm<sup>2</sup>, mặt sau của đĩa có lưới ô vuông 1 cm × 1 cm và 0,5 cm × 0,5 cm để thuận tiện cho việc đếm khuẩn lạc.

Bảo quản đĩa ở nhiệt độ từ 1 °C đến 30 °C.

## 5.2 Dung dịch muối pepton (MRD)

### 5.2.1 Thành phần

Pepton (sản phẩm thủy phân casein bằng enzym)	1,0 g
Natri clorua (NaCl)	8,5 g
Nước	1 000 mL

### 5.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần vào nước đựng trong bình hoặc chai dung tích 1 000 mL bằng cách đun nóng, nếu cần. Khử trùng 15 min bằng nồi hấp áp lực (6.3) ở 121 °C.

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

## 6 Thiết bị, dụng cụ

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

**6.1 Cân phân tích**, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

**6.2 Dụng cụ đo pH**, có độ chính xác đến 0,1 đơn vị pH ở nhiệt độ 20 °C đến 25 °C.

**6.3 Nồi hấp áp lực**, có thể kiểm soát ở nhiệt độ 121 °C.

**6.4 Bình định mức**, dung tích 1 000 mL.

**6.5 Pipet**, có thể phân phối thể tích 1 mL.

**6.6 Máy trộn Vortex.**

**6.7 Túi trộn nhu động**, có màng lọc, ví dụ: Stomacher bag.

**6.8 Thiết bị đồng hóa mẫu**, ví dụ: Blender hoặc Stomacher.

**6.9 Tủ ấm**, có thể duy trì được nhiệt độ  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

**6.10 Bộ đếm khuẩn lạc.**

## **7 Lấy mẫu**

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 11923 (ISO/TS 17728) <sup>[6]</sup>; đối với lấy mẫu bề mặt thịt theo TCVN 7925 (ISO 17604) <sup>[5]</sup>, lấy mẫu sữa và sản phẩm sữa theo TCVN 6400 (ISO 707) <sup>[1]</sup>.

Mẫu phòng thử nghiệm nhận được phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

## **8 Chuẩn bị mẫu thử**

**8.1 Chuẩn bị phần mẫu thử**, theo phần tương ứng của TCVN 6507 (ISO 6887).

### **8.2 Chuẩn bị huyền phù mẫu thử**

#### **8.2.1 Mẫu thực phẩm dạng rắn**

Cân 10 g phần mẫu thử, chính xác đến 0,1 mg, cho vào thiết bị đồng hóa mẫu (6.8) và thêm 90 mL dung dịch muối pepton (5.2). Trộn bằng thiết bị đồng hóa mẫu trong thời gian  $2 \text{ min} \pm 15 \text{ s}$ .

Đối với các mẫu thử dạng bột, cân 10 g phần mẫu thử, chính xác đến 0,1 mg, cho vào túi trộn nhu động (6.7) và thêm vào 90 mL dung dịch muối pepton (5.2) được làm ấm trước ở nhiệt độ  $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Xoay và lắc từ từ cho đến khi mẫu hòa tan.

CHÚ THÍCH: Sử dụng túi trộn nhu động có màng lọc để tránh để lại các mảnh nhỏ lên bề mặt môi trường nuôi cấy.

#### **8.2.2 Mẫu thực phẩm dạng lỏng**

Đối với các mẫu thử dạng lỏng, tùy thuộc mức độ nhiễm *E. coli* và coliform dự kiến, có thể sử dụng trực tiếp phần mẫu thử không pha loãng hoặc tiến hành pha loãng 1 mL phần mẫu thử trong 9 mL dung dịch muối pepton (5.2) hoặc pha loãng tiếp theo nếu số đếm lớn hơn 250 CFU/đĩa <sup>1)</sup>.

Trộn bằng máy trộn Vortex (6.6).

## **9 Cách tiến hành**

**9.1** Lấy số đĩa Compact Dry EC (5.1) cần sử dụng. Nếu cần đếm khuẩn lạc ở các độ pha loãng liên tiếp thì sử dụng một bộ bốn đĩa. Ghi nhãn đĩa với thông tin về mẫu thử và độ pha loãng.

**9.2** Mở nắp đĩa, dùng pipet (6.5) lấy 1 mL phần mẫu thử đã chuẩn bị (xem Điều 8), cho vào giữa và đẩy nắp đĩa. Phần mẫu thử sẽ khuếch tán tự động và đồng đều trên toàn bộ môi trường để chuyển thành

---

<sup>1)</sup> CFU: đơn vị hình thành khuẩn lạc.



dạng gel.

Cần thao tác cẩn thận để tránh ô nhiễm vi sinh vật.

Các mẫu có độ nhớt cao, màu đậm hoặc độ pH quá cao hoặc phản ứng với chất chỉ thị oxy hóa khử có thể ảnh hưởng đến kết quả. Đối với các mẫu như vậy, chỉ phân tích sau khi pha loãng mẫu, điều chỉnh pH của mẫu bằng dung dịch đệm hoặc các biện pháp khác.

**9.3** Lật ngược đĩa đã đậy nắp và đặt vào tủ ấm (6.9), ủ đĩa ở nhiệt độ  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong thời gian  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

Trong thời gian ủ, cần giữ kín nắp đĩa để tránh thất thoát ẩm.

**9.4** Đếm các khuẩn lạc có màu trong môi trường nuôi cấy, sử dụng bộ đếm khuẩn lạc (6.10). Khuẩn lạc *E. coli* (ngoại trừ chủng *E. coli* O157) có màu xanh lam hoặc xanh tím, khuẩn lạc của các vi khuẩn coliform khác với *E. coli* có màu đỏ hoặc màu hồng, do đó tổng số coliform là tổng số khuẩn lạc màu xanh lam, xanh tím, đỏ và hồng. Có thể đặt tấm giấy trắng ở phía dưới đĩa để thuận tiện việc đếm khuẩn lạc.

Việc đếm trên đĩa cần được điều chỉnh theo hệ số pha loãng.

Khi khó đếm khuẩn lạc do có số lượng lớn khuẩn lạc mọc trong môi trường, có thể tính tổng số khuẩn lạc bằng 20 lần số khuẩn lạc trung bình từ các ô đại diện  $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$  hoặc bằng 80 lần số khuẩn lạc trung bình từ các ô đại diện  $0,5\text{ cm} \times 0,5\text{ cm}$ , các ô này được đếm ở bốn góc của đĩa.

**9.5** Phạm vi đếm khuẩn lạc là từ 1 CFU/đĩa đến 250 CFU/đĩa. Nếu đĩa đếm có số khuẩn lạc lớn hơn 250 CFU/đĩa thì pha loãng mẫu thử bằng dung dịch pha loãng thích hợp.

## 10 Tính và biểu thị kết quả

a) Tính số lượng vi sinh vật (*E. coli* hoặc tổng số coliform) có trong mẫu thử,  $N$ , theo trung bình số khuẩn lạc từ hai độ pha loãng liên tiếp, áp dụng Công thức (1):

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

Trong đó:

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

$V$  là thể tích dịch cấy được đưa vào mỗi đĩa, tính bằng mililit ( $V = 1\text{ mL}$ );

$d$  là độ pha loãng tương ứng với dung dịch pha loãng đầu tiên được giữ lại ( $d = 1$  khi đĩa đầu

tiên được giữ lại là đĩa cấy mẫu thử dạng lỏng không pha loãng).

b) Nếu các đĩa không chứa khuẩn lạc nào thì báo cáo kết quả là:

"Có ít hơn  $\frac{1}{V \times d}$  CFU trên gam sản phẩm"

Trong đó:

$V$  là thể tích dịch cấy được đưa vào mỗi đĩa, tính bằng mililit ( $V = 1$  mL);

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

c) Nếu số đếm khuẩn lạc trên một đĩa trong khoảng từ 1 CFU/dĩa đến 3 CFU/dĩa thì báo cáo kết quả là:

"Có mặt *E. coli* (hoặc tổng số coliform) nhưng ít hơn  $\frac{4}{V \times d}$  CFU trên gam sản phẩm".

d) Nếu số đếm khuẩn lạc trên một đĩa trong khoảng từ 4 CFU/dĩa đến 9 CFU/dĩa thì tính số ước tính  $N_E$  *E. coli* (hoặc tổng số coliform) trên gam sản phẩm theo Công thức (2):

$$N_E = \frac{C}{V \times d} \quad (2)$$

Trong đó:

$C$  là số khuẩn lạc đếm được trên đĩa.

e) Trường hợp chỉ có đĩa chứa dung dịch pha loãng được nuôi cấy cuối cùng có thể đếm và có chứa từ 10 CFU/dĩa đến 250 CFU/dĩa, thì tính số lượng *E. coli* (hoặc tổng số coliform) có trên gam sản phẩm,  $N'$ , áp dụng Công thức (3):

$$N' = \frac{C}{V \times d} \quad (3)$$

f) Nếu số đếm khuẩn lạc trên một trong các đĩa có tất cả các dung dịch pha loãng đã nuôi cấy, cho số lượng *E. coli* (hoặc tổng số coliform) lớn hơn 250 CFU/dĩa, thì báo cáo kết quả là:

"có nhiều hơn  $\frac{250}{V \times d}$  CFU trên gam sản phẩm".

## **11 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin dưới đây:

a) mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;

- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) các điểm đặc biệt quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- e) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được cho là tùy chọn, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- f) kết quả thử nghiệm thu được.

**Phụ lục A**

(tham khảo)

**Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp  
và phép thử liên phòng thử nghiệm**

**A.1 Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp do AOAC thực hiện**

Các thử nghiệm xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này do AOAC thực hiện lần đầu năm 2006 <sup>[13]</sup>, bổ sung vào các năm 2016 <sup>[14]</sup> và 2020 <sup>[9]</sup>.

**A.1.1 Thử nghiệm về độ chọn lọc mục tiêu và độ chọn lọc loại trừ**

Kết quả thử nghiệm về độ chọn lọc mục tiêu của phương pháp đối với *E. coli* và các loài coliform khác được nêu trong Bảng A.1. Kết quả thử nghiệm về độ chọn lọc loại trừ của phương pháp đối với các loài vi sinh vật không phải coliform được nêu trong Bảng A.2.

**Bảng A.1 – Kết quả thử nghiệm về độ chọn lọc mục tiêu của phương pháp đối với  
*E. coli* và các loài coliform khác**

Chủng vi khuẩn	Số phép thử	Phản ứng màu	Số phép thử dương tính
<i>Citrobacter amolonaticus</i>	1	Đỏ/hồng	1
<i>Citrobacter freundii</i>	4	Đỏ/hồng	4
<i>Citrobacter koseri</i>	2	Đỏ/hồng	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	Hồng	4
<i>Enterobacter amnigenus</i>	4	Đỏ/hồng	4
<i>Enterobacter asburiae</i>	1	Đỏ/hồng	1
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1	Đỏ	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	Hồng	4
<i>Enterobacter gergoviae</i>	1	Đỏ/hồng	1
<i>Enterobacter intermedium</i>	2	Đỏ/hồng	2
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1	Đỏ/hồng	1
<i>Escherichia blattae</i>	1	Trắng	0
<i>Escherichia coli</i>	11	Xanh lam/xanh tím	11
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	2	Đỏ/hồng	0
<i>Escherichia coli</i> O111	2	Xanh lam	2
<i>Escherichia fergusonii</i>	2	Đỏ/hồng	2

**Bảng A.1 (kết thúc)**

Chủng vi khuẩn	Số phép thử	Phản ứng màu	Số phép thử dương tính
<i>Escherichia hermanii</i>	1	Hồng	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	Đỏ/hồng	4
<i>Klebsiella ozaenae</i>	2	Đỏ/hồng	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	Đỏ/hồng	2
<i>Klebsiella terrigena</i>	1	Đỏ/hồng	1
<b>Tổng số</b>	<b>53</b>		<b>50</b>

**Bảng A.2 – Kết quả thử nghiệm về độ chọn lọc loại trừ của phương pháp đối với các loài không phải coliform**

Chủng vi khuẩn	Số phép thử	Phản ứng màu	Số phép thử âm tính
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> subsp. <i>denitrificans</i>	1	Khuẩn lạc nhỏ màu trắng	1
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> subsp. <i>xylosoxidans</i>	1	Khuẩn lạc nhỏ màu trắng	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	Màu trắng	1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2	Màu trắng hoặc không mọc khuẩn lạc	2
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	Đỏ nhạt, hồng hoặc không mọc khuẩn lạc	1
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	Khuẩn lạc nhỏ màu trắng	1
<i>Bacillus cereus</i>	2	Không mọc khuẩn lạc	2
<i>Edwardsiella tarda</i>	3	Màu trắng	3
<i>Lactobacillus lactis</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Micrococcus luteus</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Micrococcus lylae</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Moraxella ovis</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Proteus mirabilis</i>	1	Màu nâu	1
<i>Proteus vulgaris</i>	2	Màu nâu	2
<i>Providencia alcalifaciens</i>	2	Màu nâu	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	Màu trắng	1
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Pseudomonas diminuta</i>	2	Không mọc khuẩn lạc	2
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1	Màu trắng	1

Bảng A.2 (kết thúc)

Chủng vi khuẩn	Số phép thử	Phản ứng màu	Số phép thử âm tính
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>		Khuẩn lạc nhỏ màu trắng	1
<i>Pseudomonas putida</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	Màu trắng	1
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Salmonella Choleraesuis</i>	2	Màu trắng	2
<i>Salmonella Typhimurium</i>	1	Màu trắng	1
<i>Shigella flexineri</i>	2	Màu trắng	2
<i>Shigella boydii</i>	1	Xanh lam	
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	Không mọc khuẩn lạc	3
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Streptococcus bovis</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Streptococcus canis</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Streptococcus equines</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Streptococcus sanguis</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Streptococcus uberis</i>	1	Không mọc khuẩn lạc	1
<i>Serratia marcescens</i>	1	Đỏ hoặc hồng	0
<b>Tổng số</b>	51		48

A.1.2 Thử nghiệm so sánh kết quả định lượng *E. coli* và coliform theo phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này (TCVN 13875:2023) so với các phương pháp chuẩn

Kết quả thử nghiệm xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này so với phương pháp chuẩn nêu trong AOAC 966.24 [8] đối với *E. coli* và coliform được nêu trong Bảng A.3.

Kết quả thử nghiệm xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này so với phương pháp chuẩn nêu trong TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001) [4] đối với *E. coli* được nêu trong Bảng A.4.

Kết quả thử nghiệm xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này so với phương pháp chuẩn nêu trong TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2007) [3] đối với coliform được nêu trong Bảng A.5.

Bảng A.3 – Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp định lượng *E. coli* và coliform nêu trong tiêu chuẩn này (TCVN 13875:2023) so với phương pháp chuẩn

Mức <i>E. coli</i> / coliform	TCVN 13875:2023				AOAC 966.24				
	<i>E. coli</i>		Coliform		<i>E. coli</i>		Coliform		
	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	
Mẫu thịt lợn xay chưa chế biến									
Từ 10 CFU/g đến 10 <sup>2</sup> CFU/g	1	10	1,00	10	1,00	23	1,36	23	1,36
	2	10	1,00	10	1,00	9,1	0,96	9,1	0,96
	3	5	0,70	15	1,18	9,1	0,96	9,1	0,96
	4	10	1,00	10	1,00	43	1,63	43	1,63
	5	10	1,00	10	1,00	23	1,36	39	1,59
	Trung bình	9	0,94	11	1,04	21,44	1,26	24,64	1,30
	<i>s<sub>r</sub></i> <sup>a)</sup>	2,24	0,13	2,24	0,08	13,91	0,29	16,04	0,33
	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> , %	24,85	14,32	20,33	7,61	64,89	23,27	65,09	25,27
Từ 10 <sup>2</sup> CFU/g đến 10 <sup>3</sup> CFU/g	1	510	2,71	580	2,76	640	2,81	640	2,81
	2	460	2,66	500	2,70	390	2,59	530	2,72
	3	350	2,54	420	2,62	460	2,66	460	2,66
	4	350	2,54	390	2,59	360	2,56	360	2,56
	5	370	2,57	460	2,66	280	2,45	350	2,54
	Trung bình	408	2,61	470	2,67	426	2,61	468	2,66
	<i>s<sub>r</sub></i>	72,94	0,08	74,16	0,07	135,94	0,13	121,53	0,11
	RSD <sub>r</sub> , %	17,88	2,89	15,78	2,52	31,91	5,10	25,97	4,19
Từ 10 <sup>3</sup> CFU/g đến 10 <sup>4</sup> CFU/g	1	7600	3,88	8000	3,90	4600	3,66	4600	3,66
	2	6100	3,79	6900	3,84	1100	3,04	4600	3,66
	3	1300	3,11	1200	3,08	930	2,97	2400	3,38
	4	8900	3,95	9600	3,98	2400	3,38	4600	3,66
	5	5900	3,77	6900	3,84	2400	3,38	4600	3,66
	Trung bình	5960	3,70	6520	3,73	2286	3,29	4160	3,61
	<i>s<sub>r</sub></i>	2875,41	0,34	3172,85	0,37	1468,50	0,28	983,87	0,13
	RSD <sub>r</sub> , %	48,25	9,07	48,66	9,86	64,24	8,61	23,65	3,50

Bảng A.3 (tiếp theo)

Mức <i>E. coli</i> / coliform		TCVN 13876:2023				AOAC 966.24			
		<i>E. coli</i>		Coliform		<i>E. coli</i>		Coliform	
		CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g
Mẫu không cấy vi khuẩn	1	< 10	< 1	NT <sup>c)</sup>	NT	< 10	< 1	NT	NT
	2	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	3	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	4	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	5	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	Trung bình	< 10	< 1	–	–	< 10	< 1	–	–
	s <sub>r</sub>	–	–	–	–	–	–	–	–
	RSD <sub>r</sub> , %	–	–	–	–	–	–	–	–
Mẫu thịt lợn chưa chế biến (nguyên liệu)									
Từ 10 <sup>2</sup> CFU/g đến 10 <sup>3</sup> CFU/g	1	10	1,00	100	2,00	3,6	0,56	43	1,63
	2	5	0,70	77	1,89	9,1	0,96	75	1,88
	3	15	1,18	90	1,95	15	1,18	39	1,59
	4	10	1,00	45	1,65	3,6	0,56	93	1,97
	5	10	1,00	92	1,96	3	0,48	46	1,66
	Trung bình	10	0,98	80,8	1,89	6,86	0,74	59,2	1,75
	s <sub>r</sub>	3,54	0,17	21,65	0,14	5,18	0,31	23,65	0,17
Từ 10 <sup>2</sup> CFU/g đến 10 <sup>3</sup> CFU/g	RSD <sub>r</sub> , %	35,36	17,65	26,79	7,37	75,55	41,08	39,94	9,49
	1	45	1,65	730	2,86	43	1,63	460	2,66
	2	25	1,40	920	2,96	23	1,36	460	2,66
	3	75	1,88	955	2,98	43	1,63	750	2,88
	4	20	1,30	770	2,89	43	1,63	750	2,88
	5	55	1,74	655	2,82	43	1,63	650	2,81
	Trung bình	44	1,59	806	2,90	39	1,58	614	2,78
	s <sub>r</sub>	22,47	0,24	127,54	0,07	8,94	0,12	146,39	0,11
	RSD <sub>r</sub> , %	51,07	14,99	15,82	2,37	22,93	7,70	23,84	3,89



Bảng A.3 (tiếp theo)

Mức <i>E. coli</i> / coliform		TCVN 13876:2023				AOAC 966.24			
		<i>E. coli</i>		Coliform		<i>E. coli</i>		Coliform	
		CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g
Từ 10 <sup>3</sup> CFU/g đến 10 <sup>4</sup> CFU/g	1	3030	3,48	4950	3,69	4300	3,63	4300	3,63
	2	3340	3,52	6600	3,82	2400	3,38	2400	3,38
	3	3900	3,59	10000	4,00	11000	4,04	11000	4,04
	4	2900	3,46	14000	4,15	11000	4,04	4600	3,66
	5	2680	3,43	3100	3,49	4600	3,66	4300	3,63
	Trung bình	3170	3,50	7730	3,83	6660	3,75	5320	3,67
	s <sub>r</sub>	472,86	0,06	4327,47	0,26	4050,68	0,29	3293,48	0,24
	RSD <sub>r</sub> , %	14,92	1,79	55,98	6,68	60,82	7,63	61,91	6,46
	1	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	2	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
Mẫu không cấy vì khuẩn	3	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	4	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	5	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	Trung bình	< 10	< 1	–	–	< 10	< 1	–	–
	s <sub>r</sub>	–	–	–	–	–	–	–	–
	RSD <sub>r</sub> , %	–	–	–	–	–	–	–	–
Mẫu thịt cừu chưa chế biến (nguyên liệu)									
Từ 10 CFU/g đến 10 <sup>2</sup> CFU/g	1	5	0,70	5	0,70	7,2	0,86	43	1,63
	2	10	1,00	15	1,18	9,1	0,96	23	1,36
	3	10	1,00	15	1,18	9,1	0,96	9,1	0,96
	4	10	1,00	10	1,00	9,1	0,96	9,1	0,96
	5	10	1,00	20	1,30	9,1	0,96	23	1,36
	Trung bình	9	0,94	13	1,07	8,72	0,94	21,44	1,26
	s <sub>r</sub>	2,24	0,13	5,70	0,23	0,85	0,05	13,91	0,29
	RSD <sub>r</sub> , %	24,85	14,32	43,85	21,83	9,74	4,85	64,89	23,27

Bảng A.3 (tiếp theo)

Mức <i>E. coli</i> / coliform		TCVN 13876:2023				AOAC 966.24			
		<i>E. coli</i>		Coliform		<i>E. coli</i>		Coliform	
		CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g
Từ 10 <sup>2</sup> CFU/g đến 10 <sup>3</sup> CFU/g	1	90	1,95	360	2,56	95	1,98	430	2,63
	2	120	2,08	255	2,41	120	2,08	240	2,38
	3	100	2,00	195	2,29	120	2,08	240	2,38
	4	80	1,90	130	2,11	95	1,98	430	2,63
	5	145	2,16	255	2,41	160	2,20	150	2,18
	Trung bình	107	2,02	239	2,35	118	2,06	298	2,44
	s <sub>r</sub>	25,88	0,10	85,10	0,16	26,60	0,09	125,98	0,19
	RSD <sub>r</sub> , %	24,19	5,07	35,61	6,98	22,54	4,53	42,27	7,98
	1	8500	3,93	8500	3,93	9300	3,97	9300	3,97
	2	3100	3,49	8450	3,93	9300	3,97	9300	3,97
Từ 10 <sup>3</sup> CFU/g đến 10 <sup>4</sup> CFU/g	3	2890	3,46	5040	3,70	2400	3,38	4300	3,63
	4	2660	3,42	5500	3,74	4600	3,66	4600	3,66
	5	3150	3,50	4950	3,69	4600	3,66	4600	3,66
	Trung bình	4060	3,56	6488	3,80	6040	3,73	6420	3,78
	s <sub>r</sub>	2489,59	0,21	1825,92	0,12	3108,54	0,25	2631,92	0,17
	RSD <sub>r</sub> , %	61,32	5,84	28,14	3,14	51,47	6,64	41,00	4,58
	1	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	2	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	3	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	4	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
Mẫu không cấy vi khẩn	5	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	Trung bình	< 10	< 1	–	–	< 10	< 1	–	–
	s <sub>r</sub>	–	–	–	–	–	–	–	–
	RSD <sub>r</sub> , %	–	–	–	–	–	–	–	–

Bảng A.3 (tiếp theo)

Mức <i>E. coli</i> / coliform		TCVN 13876:2023				AOAC 966.24			
		<i>E. coli</i>		Coliform		<i>E. coli</i>		Coliform	
		CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g
Mẫu thịt bê chưa chế biến (nguyên liệu)									
Từ 10 CFU/g đến 10 <sup>2</sup> CFU/g	1	10	1,00	15	1,18	3,6	0,56	9,1	0,96
	2	10	1,00	10	1,00	9,1	0,96	23	1,36
	3	10	1,00	15	1,18	9,1	0,96	43	1,63
	4	10	1,00	45	1,65	9,1	0,96	23	1,36
	5	5	0,70	5	0,70	3,6	0,56	3,6	0,56
	Trung bình	9	0,94	18	1,14	6,9	0,80	20,34	1,17
	s <sub>r</sub>	2,24	0,13	15,65	0,35	3,01	0,22	15,28	0,42
	RSD <sub>r</sub> , %	24,85	14,32	86,96	30,37	43,66	27,64	75,13	35,86
	1	80	1,90	190	2,28	21	1,32	230	2,36
	2	65	1,81	170	2,23	28	1,45	430	2,63
Từ 10 <sup>2</sup> CFU/g đến 10 <sup>3</sup> CFU/g	3	65	1,81	210	2,32	230	2,36	230	2,36
	4	25	1,40	140	2,15	43	1,63	150	2,18
	5	85	1,93	190	2,28	23	1,36	93	1,97
	Trung bình	64	1,77	180	2,25	69	1,63	226,6	2,30
	s <sub>r</sub>	23,56	0,22	26,46	0,07	90,41	0,43	127,58	0,25
	RSD <sub>r</sub> , %	36,81	12,15	14,70	2,98	131,03	26,38	56,30	10,74
	1	660	2,82	2800	3,45	930	2,97	2300	3,36
	2	650	2,81	2800	3,45	210	2,32	4300	3,63
	3	720	2,86	2000	3,30	2300	3,36	4300	3,63
	4	710	2,85	2100	3,32	430	2,63	2400	3,38
Từ 10 <sup>3</sup> CFU/g đến 10 <sup>4</sup> CFU/g	5	510	2,71	1400	3,15	430	2,63	2400	3,38
	Trung bình	650	2,81	2220	3,33	860	2,78	3140	3,48
	s <sub>r</sub>	83,96	0,06	593,30	0,12	847,17	0,40	1059,72	0,14
	RSD <sub>r</sub> , %	12,92	2,15	26,73	3,74	98,51	14,21	33,75	4,09

Bảng A.3 (kết thúc)

Mức <i>E. coli</i> / coliform		TCVN 13876:2023				AOAC 966.24			
		<i>E. coli</i>		Coliform		<i>E. coli</i>		Coliform	
		CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g	CFU/g	log <sub>10</sub> CFU/g
Mẫu không cấy vi khuẩn	1	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	2	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	3	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	4	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	5	< 10	< 1	NT	NT	< 10	< 1	NT	NT
	Trung bình	< 10	< 1	< 10	< 1	< 10	< 1	< 10	< 1
	<i>s<sub>r</sub></i>	–	–	–	–	–	–	–	–
	RSD <sub>r</sub> , %	–	–	–	–	–	–	–	–
	a) <i>s<sub>r</sub></i> = độ lệch chuẩn lặp lại;								
	b) RSD <sub>r</sub> = độ lệch chuẩn tương đối lặp lại;								
	c) NT: không thử nghiệm. Số đếm vi khuẩn coliform đã được thử nghiệm trên mẫu nhiễm tự nhiên.								

**Bảng A.4 – Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp định lượng *E. coli* nêu trong tiêu chuẩn này (TCVN 13875:2023) so với phương pháp chuẩn [TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001)]**

Nền mẫu	Mức nhiệm	TCVN 13875:2023			TCVN 7924-2 (ISO 16649-2)			Chênh lệch giá trị trung bình <sup>d)</sup>		95 % CI <sup>e)</sup>		<i>r</i> <sup>2 h)</sup>
		Trung bình Log <sub>10</sub> CFU <sup>a)</sup> /g	<i>s<sub>r</sub></i> <sup>b)</sup>	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> , %	Trung bình Log <sub>10</sub> CFU <sup>b)</sup> /g	<i>s<sub>r</sub></i>	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> , %			LCL <sup>f)</sup>	UCL <sup>g)</sup>	
Thịt gà nấu chín	1	0,000	0,000	NA <sup>i)</sup>	0,000	0,000	NA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,95
	2	0,577	0,617	107	0,341	0,554	162	0,236	-0,336	0,809		
	3	2,470	0,126	5,10	2,312	0,184	7,96	0,158	-0,015	0,300		
	4	3,511	0,111	3,16	3,340	0,283	8,47	0,172	-0,025	0,318		
	5	4,473	0,147	3,29	4,310	0,207	4,80	0,163	0,020	0,305		
Rau diếp	1	0,000	0,000	NA	0,000	0,000	NA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,94
	2	0,754	0,663	87,9	0,521	0,549	105	0,233	-0,374	0,841		
	3	2,676	0,303	11,3	2,558	0,167	6,53	0,118	-0,067	0,304		
	4	3,737	0,404	10,8	3,559	0,300	8,43	0,178	0,034	0,322		
	5	4,635	0,429	9,26	4,273	0,275	6,44	-0,362	-0,124	0,600		
Cá đông lạnh	1	0,000	0,000	NA	0,000	0,000	NA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,99
	2	1,833	0,260	14,2	1,821	0,332	18,2	0,012	-0,271	0,294		
	3	2,832	0,135	4,77	2,827	0,101	3,57	0,005	-0,085	0,095		
	4	3,796	0,215	5,66	3,859	0,143	3,71	-0,063	-0,133	0,006		
	5	4,845	0,189	3,90	4,749	0,222	4,67	0,095	0,005	0,185		
Sữa bột	1	0,000	0,000	NA	0,000	0,000	NA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,99
	2	2,837	0,307	10,8	2,838	0,218	7,68	-0,001	-0,146	0,144		
	3	3,520	0,139	3,95	3,551	0,182	5,13	-0,030	-0,111	0,050		
	4	4,201	0,028	0,67	4,564	0,217	4,75	-0,363	-0,519	-0,207		
	5	5,561	0,267	4,80	5,521	0,252	4,56	0,040	-0,069	0,149		

<sup>a)</sup> Giá trị trung bình từ năm phần mẫu thử lặp lại, các đĩa lặp, sau khi chuyển thành dạng logarit: log<sub>10</sub>[CFU/g + (0,1)<sup>f)</sup>; CFU = đơn vị hình thành khuẩn lạc; <sup>b)</sup> *s<sub>r</sub>* = độ lệch chuẩn lặp lại;

<sup>c)</sup> RDS<sub>r</sub> = độ lệch chuẩn tương đối lặp lại; <sup>d)</sup> chênh lệch giá trị trung bình (DOM) giữa hai phương pháp; <sup>e)</sup> CI = khoảng tin cậy của DOM; <sup>f)</sup> LCL = giới hạn dưới khoảng tin cậy của DOM;

<sup>g)</sup> LUL = giới hạn dưới khoảng tin cậy của DOM; <sup>h)</sup> bình phương của hệ số tương quan; <sup>i)</sup> Không áp dụng.

**Bảng A.5 – Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp định lượng coliform nêu trong tiêu chuẩn này (TCVN 13875:2023) so với phương pháp chuẩn [TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2007)]**

Nền mẫu	Mức nhiệm	TCVN 13875:2023			TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2007)			Chênh lệch giá trị trung bình <sup>d)</sup>	95 % CI <sup>e)</sup>		$r^{2h)}$
		Trung bình Log <sub>10</sub> CFU <sup>a)</sup> /g	$s_r^{b)}$	RSD <sup>c)</sup> , %	Trung bình Log <sub>10</sub> CFU <sup>b)</sup> /g	$s_r$	RSD <sup>c)</sup> , %		LCL <sup>f)</sup>	UCL <sup>g)</sup>	
Thịt gà nấu chín	1	0,000	0,000	NA <sup>i)</sup>	0,000	0,000	NA	0,000	0,000	0,000	0,98
	2	0,577	0,617	107	0,774	0,552	71,3	-0,197	-0,525	0,131	
	3	2,473	0,123	4,97	2,448	0,134	5,47	0,026	-0,017	0,068	
	4	3,514	0,112	3,19	3,428	0,248	7,23	0,085	-0,038	0,209	
	5	4,473	0,147	3,29	4,353	0,133	3,06	0,120	0,013	0,253	
Rau diếp	1	0,000	0,000	NA	0,000	0,000	NA	0,000	0,000	0,000	0,94
	2	1,700	0,829	48,8	2,216	0,531	24,0	-0,756	-1,057	0,025	
	3	3,813	0,197	5,17	4,026	0,153	3,80	-0,212	-0,287	-0,138	
	4	4,635	0,429	9,26	4,241	0,202	4,76	0,394	0,058	0,730	
	5	5,053	0,111	2,20	4,955	0,126	2,54	0,098	-0,019	0,177	
Cá đông lạnh	1	0,945	0,516	54,6	1,748	0,296	16,9	-0,802	-1,078	-0,527	0,96
	2	2,042	0,233	11,4	2,169	0,180	8,3	-0,127	-0,262	0,008	
	3	3,030	0,130	4,29	3,098	0,116	3,74	-0,068	-0,176	0,039	
	4	4,010	0,193	4,81	4,090	0,135	3,30	-0,080	-0,150	-0,010	
	5	5,091	0,146	2,87	5,097	0,179	3,51	-0,006	-0,056	0,045	
Sữa bột	1	0,653	0,568	87,0	0,000	0,000	NA	0,653	-0,246	1,060	0,92
	2	1,797	1,058	58,9	2,041	0,735	36,0	-0,244	-0,690	0,202	
	3	2,661	0,119	4,47	2,719	0,236	8,68	-0,058	-0,190	0,074	
	4	3,960	0,072	1,82	3,972	0,079	1,99	-0,012	-0,057	0,033	
	5	4,648	0,225	4,84	4,951	0,177	3,58	-0,303	-0,389	-0,218	

<sup>a)</sup> Giá trị trung bình từ năm phần mẫu thử lặp lại, các địa lặp, sau khi chuyển thành dạng logarit:  $\log_{10}[\text{CFU/g} + (0,1)^j]$ ; CFU = đơn vị hình thành khuẩn lạc; <sup>b)</sup>  $s_r$  = độ lệch chuẩn lặp lại;

<sup>c)</sup> RDS<sub>r</sub> = độ lệch chuẩn tương đối lặp lại; <sup>d)</sup> chênh lệch giá trị trung bình (DOM) giữa hai phương pháp; <sup>e)</sup> CI = khoảng tin cậy của DOM; <sup>f)</sup> LCL = giới hạn dưới khoảng tin cậy của DOM;

<sup>g)</sup> LUL = giới hạn trên khoảng tin cậy của DOM; <sup>h)</sup> bình phương của hệ số tương quan; <sup>i)</sup> không áp dụng.

### A.1.3 Thử nghiệm đánh giá độ chụm đối với *E. coli* và coliform

#### a) Đánh giá độ chụm đối với *E. coli*

Thử nghiệm đánh giá độ chụm của phương pháp có 14 phòng thử nghiệm tham gia, trong đó dữ liệu thống kê được lấy từ 9 phòng thử nghiệm. Mẫu thử sữa thanh trùng được cấy *E. coli* với lượng xác định. Kết quả được nêu trong Bảng A.6.

**Bảng A.6 – Kết quả đánh giá độ chụm của phương pháp định lượng *E. coli* nêu trong tiêu chuẩn này (TCVN 13875:2023) so với phương pháp chuẩn [TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001)]**

Mức gây nhiễm	Giá trị trung bình, log <sub>10</sub> [CFU/g + (0,1) <sup>f</sup> ]		Độ chệch	LCL <sup>a)</sup>	UCL <sup>b)</sup>	<i>r</i> <sup>2</sup> <sup>c)</sup>
	TCVN 13875:2023	TCVN 7924-2 (ISO 16649-2)				
Không nhiễm	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,97
Thấp	2,437	2,436	0,001	-0,059	0,053	
Trung bình	3,458	3,484	-0,026	-0,050	0,109	
Cao	4,553	4,382	0,171	-0,261	-0,055	
a) LCL: giới hạn dưới với độ tin cậy 95 % của độ chệch giữa hai phương pháp. b) UCL: giới hạn trên với độ tin cậy 95 % của độ chệch giữa hai phương pháp. c) <i>r</i> <sup>2</sup> : bình phương của hệ số tương quan.						

#### b) Đánh giá độ chụm đối với coliform

Thử nghiệm đánh giá độ chụm của phương pháp có 14 phòng thử nghiệm tham gia, trong đó dữ liệu thống kê được lấy từ 11 phòng thử nghiệm. Mẫu thử sữa thanh trùng được cấy các vi khuẩn coliform với lượng xác định. Kết quả được nêu trong Bảng A.7.

**Bảng A.7 – Kết quả đánh giá độ chụm của phương pháp định lượng coliform nêu trong tiêu chuẩn này (TCVN 13875:2023) so với phương pháp chuẩn [TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2007)]**

Mức gây nhiễm	Giá trị trung bình		Độ chệch	LCL	UCL	$r^2$
	TCVN 13875:2023	TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2007)				
Không nhiễm	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,99
Thấp	2,553	2,542	0,011	-0,058	0,036	
Trung bình	3,566	3,591	-0,025	-0,012	0,068	
Cao	4,570	4,468	0,102	-0,183	0,019	
a) LCL: giới hạn dưới với độ tin cậy 95 % của độ chệch giữa hai phương pháp. b) UCL: giới hạn trên với độ tin cậy 95 % của độ chệch giữa hai phương pháp. c) $r^2$ : bình phương của hệ số tương quan.						

## A.2 Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp do NMKL - NordVal International thực hiện

Thử nghiệm xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp định lượng *E. coli* và coliform nêu trong tiêu chuẩn này so với phương pháp chuẩn do NMKL - NordVal International thực hiện năm 2008 và bổ sung năm 2020 [11].

### a) Đánh giá độ chụm đối với *E. coli*

Thử nghiệm đánh giá độ chụm của phương pháp có 13 phòng thử nghiệm tham gia, trong đó dữ liệu thống kê được lấy từ 9 phòng thử nghiệm (có 2 phòng thử nghiệm bị loại do không thực hiện phép thử đúng thời gian đã định và 2 phòng thử nghiệm bị loại do lỗi khi thực hiện phép thử *E. coli* theo phương pháp chuẩn). Mẫu thử sữa thanh trùng được cấy *E. coli* với lượng xác định. Kết quả được nêu trong Bảng A.8.

**Bảng A.8 – Kết quả đánh giá độ chụm của phương pháp định lượng *E. coli* nêu trong tiêu chuẩn này (TCVN 13875:2023) so với phương pháp chuẩn [TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001)]**

Mức	TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001)		TCVN 13875:2023		Độ chệch	Mức trên	Mức dưới	AL <sup>a)</sup> trên	AL dưới
	Trung vị	S <sub>R</sub> <sup>a)</sup>	Trung vị	S <sub>R</sub>					
1	2,40	0,17	2,45	0,18	0,05	0,30	-0,04	0,50	-0,50
2	3,50	0,17	3,46	0,17	-0,04	0,20	-0,17	0,50	-0,50
3	4,38	0,34	4,50	0,20	0,12	0,40	0,01	0,50	-0,50

<sup>a)</sup> S<sub>R</sub>: độ lệch chuẩn tương đối tái lập; <sup>b)</sup> AL: giới hạn chấp nhận được.

### b) Đánh giá độ chụm đối với coliform

Thử nghiệm đánh giá độ chụm của phương pháp có 11 phòng thử nghiệm tham gia. Mẫu thử sữa thanh trùng được cấy các vi khuẩn coliform với lượng xác định. Kết quả được nêu trong Bảng A.9.

**Bảng A.9 – Kết quả đánh giá độ chụm của phương pháp định lượng coliform nêu trong tiêu chuẩn này (TCVN 13875:2023) so với phương pháp chuẩn [TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2007)]**

Mức	TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2007)		TCVN 13875:2023		Độ chệch	Mức trên	Mức dưới	AL <sup>a)</sup> trên	AL dưới
	Trung vị	S <sub>R</sub> <sup>a)</sup>	Trung vị	S <sub>R</sub>					
1	2,53	0,16	2,55	0,13	0,02	0,20	-0,09	0,50	-0,50
2	3,59	0,11	3,57	0,19	-0,02	0,25	-0,10	0,50	-0,50
3	4,48	0,075	4,59	0,15	0,11	0,32	0,00	0,50	-0,50

<sup>a)</sup> S<sub>R</sub>: độ lệch chuẩn tương đối tái lập; <sup>b)</sup> AL: giới hạn chấp nhận được.



### A.3 Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp do Microval thực hiện

Thử nghiệm xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp định lượng coliform nêu trong tiêu chuẩn này so với phương pháp chuẩn nêu trong TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2007)<sup>[3]</sup> do Microval thực hiện năm 2019<sup>[12]</sup>.

#### A.3.1 Đánh giá chênh lệch giữa hai phương pháp đối với một số thông số

Kết quả thử nghiệm đánh giá chênh lệch giữa hai phương pháp đối với một số thông số được nêu trong Bảng A.10. Thử nghiệm được thực hiện bằng cả hai phương pháp, trên 75 mẫu thử thuộc 5 nhóm nền mẫu, thu được 75 kết quả để phân tích thống kê.

Tất cả các mẫu đều được cấy vi khuẩn (không nhiễm tự nhiên).

**Bảng A.10 – Chênh lệch giữa hai phương pháp đối với một số thông số**

Nhóm thực phẩm	Số lượng mẫu thử, $n$	Chênh lệch trung bình, $D$	Độ lệch chuẩn của chênh lệch trung bình, $S_D$	95 % giới hạn dưới	95 % giới hạn trên
Rau quả tươi	15	0,22874	0,105686	-0,00537	0,462848
Sữa và sản phẩm sữa	15	0,022567	0,327377	-0,70261	0,747749
Sản phẩm nhiều thành phần	15	0,347944	0,394301	-0,52548	1,22137
Thịt chưa chế biến	15	0,031564	0,201279	-0,41429	0,477421
Thực phẩm chế biến sẵn	15	-0,01184	0,169736	-0,38783	0,364144
Tổng các nhóm	75	0,123794	0,291318	-0,46053	0,708115

#### A.3.2 Đánh giá độ chụm của phương pháp

Thử nghiệm đánh giá độ chụm của phương pháp được thực hiện trên nền mẫu sữa thanh trùng với 10 phòng thử nghiệm tham gia. Mẫu thử được cấy riêng lẻ chủng *E. coli* (CCFRA code 11017, NCTC 12241) và chủng *Enterobacter aegogenes* (CCFRA code 15736, NCTC 10006). Mỗi chủng được cấy 10 mL để qua đêm ở nhiệt độ  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , cả hai chủng đều đã được pha loãng tiệt trùng với dung dịch muối đậm pepton để có được các mức dịch cấy gây nhiễm mẫu đã định và được trộn với nồng độ tương đương.

Mỗi phòng thử nghiệm nhận được 8 nền mẫu, mỗi mẫu 25 mL. Độ pha loãng thích hợp của hỗn hợp vi khuẩn được sử dụng để cấy riêng rẽ 2 x 25 mL mẫu thử cho mức nhiễm thu được là: mức thấp (khoảng 10 CFU/mL đến  $10^2$  CFU/mL), mức trung bình ( $10^2$  CFU/mL đến  $10^3$  CFU/mL) và mức cao ( $10^3$  CFU/mL đến  $10^4$  CFU/mL).

Kết quả được nêu trong Bảng A.11.

**Bảng A.11 – Kết quả đánh giá độ chụm của phương pháp định lượng coliform nêu trong tiêu chuẩn này (TCVN 13875:2023) so với phương pháp chuẩn [TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2007)]**

Phương pháp	TCVN 13875:2023	TCVN 6848 (ISO 4832)	TCVN 13875:2023	TCVN 6848 (ISO 4832)	TCVN 13875:2023	TCVN 6848 (ISO 4832)
Mức nhiễm	Thấp		Trung bình		Cao	
Số phòng thử nghiệm	10	10	10	10	10	10
Giá trị trung bình, $\text{Log}_{10}$ CFU/g	2,567	2,556	3,589	3,614	4,587	4,474
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$	0,132	0,106	0,080	0,084	0,080	0,150
Độ lệch chuẩn lặp lại giữa các phòng thử nghiệm, $s_L$	0,086	0,074	0,101	0,038	0,096	0,164
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$	0,157	0,130	0,129	0,092	0,125	0,222
Độ chênh giữa hai phương pháp	0,011		-0,025		0,113	
Giới hạn dưới của dung sai ( $\beta = 80 \%$ )	-0,205		-0,205		-0,061	
Giới hạn trên của dung sai ( $\beta = 80 \%$ )	0,228		0,156		0,288	
Giới hạn chấp nhận được	$\pm 0,5$		$\pm 0,5$		$\pm 0,5$	

## Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
- [2] TCVN 6404:2016 (ISO 7218:2007 with Amendment 1:2013), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật*
- [3] TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2007), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng coliform – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc*
- [4] TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Escherichia coli dương tính  $\beta$ -glucuronidaza – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng 5-bromo-4-clo-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronid*
- [5] TCVN 7925 (ISO 17604), *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Lấy mẫu thân thịt để phân tích vi sinh vật*
- [6] TCVN 11923 (ISO/TS 17728), *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Kỹ thuật lấy mẫu để phân tích vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi*
- [7] AOAC 966.23, *Microbiological Methods*
- [8] AOAC 966.24, *Coliform group and Escherichia coli. Microbiological method*
- [9] AOAC Research Institute (2020), *AOAC 110402 - Compact Dry EC (Escherichia coli)*
- [10] Department of Agriculture and Water Resources (Australia), *Compact Dry EC - AOAC 110402*
- [11] NMKL - NordVal International (2020), *Compact Dry EC Method for the Enumeration of Escherichia coli and coliforms*
- [12] Microval (2019), *Method Comparison Study Report for the ISO 16140-2:2016 validation of Compact Dry EC, for the enumeration of coliforms*
- [13] Kodaka H., Mizuochi S., Teramura H., Nirazuka T. (2006), “Comparison of the compact dry EC with the most probable number method (AOAC official method 966.24) for enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria in raw meats. Performance-Tested Method 110402”, *Journal of AOAC International*, Volume 89, Issue 1, Pages 100-14
- [14] Mizuochi S., Nelson M., Baylis C., Green B., Jewell K., Monadjemi F., Chen Y., Salfinger Y. (2016), “Fernandez MC. Matrix Extension Study: Validation of the Compact Dry EC Method for Enumeration

of *Escherichia coli* and non-*E. coli* Coliform Bacteria in Selected Foods”, *Journal of AOAC International*, Volume 99, Issue 2, Pages 451-60

- [15] H. Teramura, K. Sota, M. Iwasaki, H. Ogihara (2017), “Comparison of the quantitative dry culture methods with both conventional media and most probable number method for the enumeration of coliforms and *Escherichia coli*/coliforms in food”, *J. of Applied Microbiology*, Volume 65, Issue 1, p. 57-65
-