

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

TUYỂN TẬP
TIÊU CHUẨN NÔNG NGHIỆP
VIỆT NAM

PROCEEDINGS OF VIETNAM AGRICULTURAL STANDARDS

17

TẬP V
TIÊU CHUẨN CHĂN NUÔI
PHẦN 2: SẢN PHẨM CHĂN NUÔI

HÀ NỘI, 2003

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

**TUYỂN TẬP
TIÊU CHUẨN NÔNG NGHIỆP
VIỆT NAM**

PROCEEDINGS OF VIETNAM AGRICULTURAL STANDARDS

TẬP V

TIÊU CHUẨN CHĂN NUÔI

PHẦN 2: SẢN PHẨM CHĂN NUÔI

HÀ NỘI, 2003

MỤC LỤC

	Trang
I. THỊT VÀ SẢN PHẨM CỦA THỊT	
1. Quy phạm về kiểm tra động vật trước và sau khi giết mổ và đánh giá động vật và thịt trước và sau khi giết mổ. TCVN 6162 - 1996	7
2. Thịt lợn - Pha lọc và phân hạng trong thương nghiệp bán lẻ. TCVN 2830 - 79	51
3. Thịt lạnh đông - Quy định kỹ thuật. TCVN 7047 - 2002	54
4. Lợn sữa lạnh đông xuất khẩu. 10 TCN 508 - 2002	59
5. Lợn choai lạnh đông xuất khẩu. 10 TCN 509 - 2002	62
6. Thịt hộp - Quy định kỹ thuật. TCVN 7048 : 2002	65
7. Thịt chế biến có xử lý nhiệt - Quy định kỹ thuật. TCVN 7049 : 2002	69
8. Thịt chế biến không qua xử lý nhiệt - Quy định kỹ thuật. TCVN 7050 : 2002	74
9. Thịt và sản phẩm thịt - Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử - Phần 1: Lấy mẫu. TCVN 4833 - 1: 2002	79
10. Thịt và sản phẩm thịt - Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử - Phần 2: Chuẩn bị mẫu thử để kiểm tra vi sinh vật. TCVN 4833 - 2: 2002	84
11. Thịt và sản phẩm thịt - Đo độ pH - Phương pháp chuẩn. TCVN 4835 : 2002	90
12. Thịt và sản phẩm thịt - Phương pháp xác định hàm lượng clorua. TCVN 4836 - 89	95
13. Thịt và sản phẩm của thịt - Phương pháp xác định dư lượng Penicillin. TCVN 5147 - 90	98
14. Thịt và sản phẩm của thịt - Phương pháp xác định dư lượng kháng sinh Streptomycin. TCVN 5148 - 90	101
15. Thịt và sản phẩm của thịt - Phương pháp xác định dư lượng kháng sinh aureomycin. TCVN 5149 - 90	104
16. Thịt và sản phẩm của thịt - Phương pháp xác định dư lượng hoocmon thyroxin. TCVN 5150 - 90	107
17. Thịt và sản phẩm của thịt - Phương pháp xác định hàm lượng chì (P_b). TCVN 5151 - 1990	110
18. Thịt và sản phẩm thịt - Phương pháp xác định hàm lượng thủy ngân (Hg). TCVN 5152 - 90	113
19. Thịt và sản phẩm thịt - Phương pháp phát hiện Salmonella. TCVN 5153 - 1990	116
20. Thịt và sản phẩm của thịt - Phương pháp phát hiện Bacillus Anthracis. TCVN 5154 - 90	126
21. Thịt và sản phẩm của thịt - Phương pháp phát hiện và đếm số Escherichia Coli. TCVN 5155 - 90	133
22. Thịt và sản phẩm của thịt - Phương pháp phát hiện và đếm số Staphylococcus aureus. TCVN 5156 - 90	138
23. Thịt và sản phẩm của thịt - Phương pháp phát hiện vi rút dịch tả lợn. TCVN 5157 - 90	143
24. Thịt tươi - Hướng dẫn chung về kỹ thuật chế biến và yêu cầu vệ sinh. TCVN 5168 - 90	151
25. Đồ hộp thịt và rau - Phương pháp xác định hàm lượng nitrit và nitrat. TCVN 5247 - 90.	164
26. Thịt và sản phẩm thịt - Định lượng E.coli - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng màng lọc. TCVN 7135 : 2002	169
27. Thịt và sản phẩm thịt - Phát hiện và định lượng enterobacteriaceae không qua quá trình phục hồi - Kỹ thuật đếm MPN và kỹ thuật đếm khuẩn lạc. TCVN 7136 : 2002	175
28. Thịt và sản phẩm thịt - Định lượng nấm men và nấm mốc - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc. TCVN 7137 : 2002	188
29. Thịt và sản phẩm thịt - Định lượng Pseudomonas Spp. TCVN 7138 : 2002.	194
30. Thịt và sản phẩm thịt - Định lượng Brochothrix thermosphacta - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc. TCVN 7139 : 2002	202

31.	Thịt và sản phẩm thịt - Phát hiện phẩm màu - Phương pháp sử dụng sắc ký lớp mỏng. TCVN 7140 : 2002	208
32.	Thịt và sản phẩm thịt - Phương pháp xác định phospho tổng số - Phương pháp quang phổ. TCVN 7141 : 2002	217
33.	Thịt và sản phẩm thịt - Xác định tro tổng số. TCVN 7142 - 2002	221
II. TRỨNG		
34.	Trứng vịt ấp. TCVN 3716 - 82	227
35.	Trứng vịt tươi thương phẩm. TCVN 1442 - 86	229
36.	Trứng gà tươi thương phẩm. TCVN 1858 - 86	232
37.	Trứng gà giống và trứng vịt giống. TCVN 4300 - 86	235
III. SỮA		
38.	Sữa - Định lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc từ các vi sinh vật ưa lạnh - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 6,5°C. TCVN 6261 : 1997	241
39.	Sữa và các sản phẩm sữa - Định lượng Coliform Phần 1 - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C. TCVN 6262 - 1: 1997	247
40.	Sữa và các sản phẩm sữa - Định lượng Coliform Phần 2 - Kỹ thuật đếm số có sắc xuất lớn nhất ở 30°C (MPN). TCVN 6262-2: 1997	257
41.	Sữa và các sản phẩm sữa - Định lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc từ các vi sinh vật - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C. TCVN 6264: 1997	268
42.	Sữa và các sản phẩm sữa - Định lượng đơn vị khuẩn lạc nấm men và/ hoặc nấm mốc - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 25°C. TCVN 6265 : 1997	274
43.	Sữa và các sản phẩm sữa - Lấy mẫu - Kiểm tra theo dấu hiệu định lượng. TCVN 6267 : 1997	280
44.	Sữa và sản phẩm sữa - Xác định dư lượng hợp chất clo hữu cơ (thuốc trừ sâu). Phần 1 : Xem xét chung và phương pháp chiết. TCVN 7082 - 1: 2002	286
IV. MẬT ONG		
45.	Sản phẩm ong - Thuật ngữ định nghĩa. TCVN 5260 - 90	303
46.	Sản phẩm ong - Phương pháp lấy mẫu. TCVN 5261- 90	306
47.	Sản phẩm ong - Phương pháp thử cảm quan. TCVN 5262 - 90	309
48.	Sản phẩm ong - Phương pháp xác định chất rắn không tan trong nước. TCVN 5264 - 90	311
49.	Mật ong tự nhiên - Yêu cầu kỹ thuật. TCVN 5267 - 1990	313
50.	Sữa chúa tự nhiên - Phương pháp xác định hàm lượng axit 10 - hydđro - 2 - dextrin. TCVN 5272 - 90	316

TIÊU CHUẨN CHĂN NUÔI

PHẦN 2: SẢN PHẨM CHĂN NUÔI

I - THỊT VÀ SẢN PHẨM CỦA THỊT

QUY PHẠM VỀ KIỂM TRA ĐỘNG VẬT TRƯỚC VÀ SAU KHI GIẾT MỔ VÀ ĐÁNH GIÁ ĐỘNG VẬT VÀ THỊT TRƯỚC VÀ SAU KHI GIẾT MỔ

Code for ante-mortem and post-mortem inspection of slaughter animals and for ante-mortem and post-mortem judgement of slaughter animals and meat

TCVN 6162: 1996 hoàn toàn tương đương với CAC/RCP 41: 1993

Lời giới thiệu

Khoa học thú y và khoa học vệ sinh về thịt phải được áp dụng cho toàn bộ dây chuyền thực phẩm, bắt đầu từ trại nuôi động vật để cho thịt tươi được sản xuất ra từ động vật giết mổ phải an toàn và hoàn hảo. Tiêu chuẩn này cùng với tiêu chuẩn thực hành vệ sinh đối với thịt tươi phải đưa ra các yêu cầu cần thiết để đạt được mục đích đó. Những thực hành truyền thống có thể cho phép lệch hướng cho một số yêu cầu khi thịt tươi được yêu cầu khi thịt tươi được tiêu thụ nội địa.

A- Nguyên tắc và mục đích của tiêu chuẩn này và tiêu chuẩn thực hành vệ sinh đối với thịt tươi

1. Việc kiểm tra trước và sau khi giết mổ đối với động vật và duy trì thực hành vệ sinh, thực hiện nhằm đảm bảo an toàn và hoàn hảo đối với thịt tươi sản xuất làm thực phẩm cho người.
2. Các quy tắc kiểm tra thịt và thực hành vệ sinh nêu trong tiêu chuẩn này và trong các quy phạm có liên quan qui định các yêu cầu dựa trên kiến thức và khoa học thực tiễn hiện tại.
3. Phân tích rủi ro dựa trên phương pháp luận khoa học đã được công nhận, phải được thực hiện ở bất kỳ nơi nào có thể để nâng cao kiến thức hiện hành. Những phân tích này sẽ khuyến khích các nguyên tắc vệ sinh thịt sau đây:
 - a. Phải có các tiêu chuẩn an toàn thực phẩm phù hợp, để đảm bảo việc cung cấp thịt một cách an toàn và hoàn hảo; nếu việc cung cấp thực phẩm bị đe dọa bởi những bối cảnh thương mại nội địa thì các tiêu chuẩn an toàn có thể bao gồm cả các biện pháp xử lý đủ để loại trừ nguy hại.
 - b. Các thủ tục kiểm tra trước và sau khi giết mổ phải phù hợp với hình ảnh và tình hình của các dịch bệnh và khiếm khuyết hiện hành đối với từng loại động vật giết mổ mà động vật này được kiểm tra.
 - c. Các hệ thống quá trình kiểm tra phải hạn chế được sự ô nhiễm vi sinh vật tới mức thấp nhất có thể có được và phải không chế được sự phát triển của vi sinh vật tới mức thấp nhất.
 - d. Xác lập điểm kiểm soát trọng yếu bằng phân tích mối nguy hiểm trong quá trình sản xuất

Ban hành theo quyết định của Bộ khoa học, Công nghệ và Môi trường.

(Hazard Analysis critical control Point-HACCP)¹ dưới sự giám sát của cơ quan kiểm tra có thẩm quyền là một phương pháp khoa học bảo đảm an toàn thực phẩm và tính hoàn hảo trong suốt quá trình sản xuất, chế biến và phân phối thịt tươi, vì vậy HACCP và các thủ tục an toàn khác phải được áp dụng ở mọi nơi có thể cùng với các thủ tục bảo đảm chất lượng khác trong khi áp dụng tiêu chuẩn này.

- e. Nơi nào, qua phân tích rủi ro thấy rằng an toàn không bị đe dọa, dù không xảy ra khuyết tật đối với từng loại do cơ quan kiểm tra có thẩm quyền quy định và sản phẩm vẫn được phân biệt rõ tại nơi sản xuất thì cơ quan kiểm tra phải cho phép sản xuất như đã được quy định.
4. Người sản xuất và người kiểm tra chịu trách nhiệm đối với việc sản xuất thực phẩm an toàn và hoàn hảo. Đội ngũ sản xuất phải tự nguyện tham gia rộng rãi có thể được vào hệ thống đảm bảo chất lượng, chỉ đạo và kiểm tra vệ sinh thịt cùng với việc giám sát và hướng dẫn của cơ quan kiểm tra có thẩm quyền, nhằm thực hiện bằng được việc tuân thủ theo các yêu cầu. Các chương trình giáo dục và đào tạo cho cả người sản xuất và cơ quan kiểm tra có thẩm quyền là rất cần thiết nhằm đạt được mục đích này.
5. Cơ quan kiểm tra có thẩm quyền phải có đủ khả năng, có quyền lực hợp pháp để các yêu cầu cần thiết phải được thực thi để sản xuất thịt được an toàn và hoàn hảo. Các cơ quan này phải độc lập với cơ quan quản lý lò mổ và các lợi nhuận của nhà sản xuất. Phải có các yêu cầu pháp chế đối với người quản lý để họ tuân thủ các hướng dẫn vệ sinh và quy trình kiểm tra cũng như họ phải cung cấp thông tin và hỗ trợ theo yêu cầu của cơ quan kiểm tra có thẩm quyền.
6. Để đạt được mục đích giảm những nguy hiểm trong việc sử dụng thịt, cơ quan kiểm tra có thẩm quyền phải duy trì đủ nhân lực và điều hành có hiệu quả.
7. Việc giám sát nhằm phát hiện những nguy hiểm phát sinh đối với thịt, trong quá trình sản xuất là một phần quan trọng của chương trình vệ sinh thịt. Sự hiểu biết về tình hình sức khỏe của động vật đem đi giết mổ, cũng như kiến thức về các bệnh gia súc lây sang người do sử dụng thịt là rất quan trọng trong việc áp dụng các biện pháp kiểm tra khống chế và đòi hỏi phải có hệ thống thích hợp cho việc thu nhập tài liệu.
8. Các quy định vệ sinh thịt phải có cơ sở khoa học, bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng và tạo thuận lợi cho việc kinh doanh thịt trên thị trường quốc tế.²⁾ Chính sách tương đương²⁾, đối với các nước hoặc từng khu vực của các nước, có khả năng đảm bảo sự an toàn và hoàn hảo giúp chúng ta loại bỏ việc mỗi nước riêng biệt lập lại các yêu cầu của mình và các thủ tục riêng rẽ.
9. Các cơ quan kiểm tra có thẩm quyền phải tạo điều kiện thuận lợi cho việc công nhận các công nghệ mới và các phương pháp mới với điều kiện chúng phù hợp với sản xuất an toàn và hoàn hảo của thịt tươi.

¹ (Hazard Analysis critical control Point- HACCP) bao gồm vệ sinh thực phẩm mà Codex thực phẩm đã chấp nhận và HACCP đã ghi thành các qui phạm HACCP là một phương pháp kiểm tra có hệ thống đối với vệ sinh thực phẩm và các thao tác chế biến thực phẩm nhằm đảm bảo vệ sinh thực phẩm phù hợp với sức khỏe con người. Chương trình của HACCP là cơ sở để đánh giá mọi rủi ro của sức khỏe con người và động vật, kể cả phân tích kỹ thuật rủi ro có thể chấp nhận được. Hệ thống HACCP đặc hiệu cho từng sản phẩm, cho các điều kiện chế biến và phân phối cho từng cơ sở giết mổ hay cơ sở chế biến. Các nguyên tắc và các biện pháp áp dụng của HACCP phải được ghi ở qui phạm thực hành của Codex và các tài liệu khác của Codex Alimentarius.

²⁾ Chữ "tương đương" không được định nghĩa tách riêng đối với mục đích của tiêu chuẩn này nhưng phải có ý nghĩa như hiệp định về thuế quan và thương mại (GATT) đã cho. Văn bản sau đây đề cập đến những biện pháp vệ sinh và bảo vệ thực vật trích từ dự thảo thỏa thuận thwuwng mại đa phương ở hội nghị Uruguay.

"Những bên ký thỏa thuận phải chấp nhận những biện pháp vệ sinh và bảo vệ thực vật của phái bên kia là tương đương" ngay khi những biện pháp này khác với những biện pháp của các bên ký kết trên cùng một sản phẩm thwuwng mại, với điều kiện là bên xuất sản phẩm chứng minh cho bên nhập sản phẩm rằng những biện pháp đã nêu được đảm bảo vệ sinh và an toàn. Ở mục tieemujnayf, người ta phải đảm bảo cho bên nhập quyền tiến hành kiểm tra, xenut nghiệm hay những thủ tục liên quan khác.

Các bên ký kết theo yêu cầu cần phải hỏi ý kiến của nhau nhằm mục đích ký kết các hiệp định song phương và đa phương để thừa nhận "tương đương" những biện pháp vệ sinh và bảo vệ thực vật

10. Các cơ quan kiểm tra có thẩm quyền phải tăng cường thực hiện an toàn thực phẩm một cách đồng bộ, trong khi phải tính tới các khía cạnh cơ bản của an toàn thực phẩm và toàn bộ sự hiểu biết về an toàn thực phẩm. Hoạt động này phải đi đôi với hợp tác quốc tế nhằm vào các chương trình an toàn thực phẩm.

B. Tên gọi rút gọn

Tên gọi rút gọn của tiêu chuẩn này là “tiêu chuẩn kiểm tra và đánh giá” (đối với thịt tươi).

CHƯƠNG 1: PHẠM VI ÁP DỤNG

Tiêu chuẩn này áp dụng cho:

a) Kiểm tra trước và sau khi giết mổ đối với động vật³⁾ khi những động vật này được sử dụng cho người, trừ những động vật đã quy định ở các tiêu chuẩn quy phạm Codex khác, cho gia cầm, cá và thú rừng⁴⁾; và

b) Đánh giá tại lò mổ, những động vật giết mổ và thịt của chúng.

Tiêu chuẩn này phải được áp dụng cùng với tiêu chuẩn về thực hành vệ sinh đối với thịt tươi.

Tiêu chuẩn này cũng coi như hướng dẫn chung để đánh giá động vật giết mổ khác nhau và các địa điểm khác nhau ngoài địa điểm là lò mổ.

CHƯƠNG 2: NGUYÊN TẮC VÀ MỤC ĐÍCH CỦA TIÊU CHUẨN NÀY

Nguyên tắc và mục đích của tiêu chuẩn này là:

- Việc kiểm tra trước và sau khi giết mổ đối với động vật được thực hiện nhằm đảm bảo thịt tươi làm thực phẩm cho người phải an toàn và hoàn hảo. Cơ quan kiểm tra có thẩm quyền và nhà sản xuất phải có trách nhiệm thực hiện mục tiêu này;
- Việc kiểm tra trước và sau khi giết mổ phải được tiến hành dưới trách nhiệm và sự giám sát của kiểm tra viên thú y, là cơ sở cho phép động vật được đưa vào dây chuyền thực phẩm, trước tiên phải là sự xem xét các khía cạnh y tế, sau đó mới đến giá trị kinh tế của động vật;
- Các chương trình kiểm tra trước và sau khi giết mổ phải được thực hiện một cách có hiệu quả, và lực lượng kiểm tra phải được phân chia theo các nguy hại ở từng khâu trong toàn bộ hệ thống kiểm tra;
- Thu thập các thông tin về tình trạng sức khỏe của động vật có mặt ở lò mổ là cần thiết để cho việc kiểm tra trước và sau khi giết mổ đạt được tối ưu⁵⁾;
- Thủ tục kiểm tra áp dụng cho từng loài động vật giết mổ phải phù hợp với tỷ lệ mắc bệnh, số lần phát sinh bệnh và những hạn chế cho từng loài gia súc; lịch sử sản xuất, xuất xứ của động vật giết mổ và tình hình dịch bệnh⁶⁾ trong nước hay khu vực phải được tính đến;

³⁾ Thương mại Quốc tế đối với thịt của nhiều loài thú hoang dã bị cấm và được điều hành bởi hiệp ước thương mại quốc tế các loài thú bị đe dọa diệt chủng (ITES).

⁴⁾ Tiêu chuẩn này không bao hàm những yêu cầu về nhân đối với thịt tươi. Do đó trong tiêu chuẩn này không có điều kiện nào cản trở việc ghi nhãn cho thịt gọi là thú săn được chế biến phù hợp với tiêu chuẩn này và tiêu chuẩn thực hành vệ sinh đối với thịt tươi khi thịt làm từ động vật được chấp nhận một cách truyền thống là thú săn, với điều kiện cơ quan kiểm tra có thẩm quyền xác nhận là nhãn này không lừa dối.

⁵⁾ Xem, thí dụ dự thảo quy phạm kiểm soát việc sử dụng thuốc thú y (Codex Alimentarius, xuất bản lần thứ 2, tập 3), đặc biệt mục 16 “Lưu giữ hồ sơ”.

⁶⁾ Niên giám thú y FAO-OMS-OIE và thông báo định kỳ của cơ quan dịch tễ Quốc tế (OIE) trình bày những nguồn thông tin chính liên quan đến tỷ lệ mắc bệnh ở phạm vi quốc gia và vùng.

- f. Các yêu cầu kiểm tra nêu trong tiêu chuẩn này dựa trên thực hành và kiến thức khoa học hiện hành; sự phân tích nguy hại phải được thực hiện nhằm hoàn thiện chương trình và phương pháp kiểm tra, thể hiện được những thành tựu của khoa học về vệ sinh thịt;
- g. Cơ quan kiểm tra có thẩm quyền phải nhận biết được tính chất giống nhau của các phương pháp kiểm tra khác nhau một khi mà những phân tích về nguy hiểm chứng minh rằng chúng đảm bảo được sự an toàn và tính hoàn hảo;
- h. Việc đánh giá động vật giết mổ và thịt của chúng sau kiểm tra trước và sau khi giết mổ phải đảm bảo là thịt làm thực phẩm cho người phải an toàn và hoàn hảo; tất cả các đánh giá phải đảm bảo rằng sức khỏe động vật phải luôn luôn được bảo vệ, phải đảm bảo được sức khỏe cho công nhân lò mổ và công nhân pha lọc thịt không có các bệnh chung giữa người và động vật;
- i. Cơ quan kiểm tra có thẩm quyền phải chịu trách nhiệm về tất cả các quyết định liên quan đến sức khỏe của người và động vật khi chấp nhận cho động vật vào lò mổ và trong quá trình kiểm tra trước và sau khi giết mổ;
- j. Việc chuẩn đoán bệnh và khuyết tật và việc đánh giá phải căn cứ vào các thông tin của công tác kiểm tra trước và sau khi giết mổ. Phải có đủ phương tiện để đảm bảo việc phân biệt động vật hoặc thịt theo từng loại đánh giá (mục 102 giành cho các loại đánh giá);
- k. Trong trường hợp nghi ngờ, các quyết định tạm thời về an toàn và tính hoàn hảo đối với động vật giết mổ hay thịt phải được xác định bằng việc kiểm tra chi tiết hơn, có thể bao gồm cả xét nghiệm trong phòng thí nghiệm; khi sự nghi ngờ không xác nhận được thì phải áp dụng loại đánh giá nghiêm khắc nhất;
- l. Trong khi không có khả năng đưa ra một đánh giá dựa trên nghiệp vụ chuyên môn thì các quy định pháp chế đối với việc đánh giá phải cung cấp một tiêu chuẩn nhất quán về đánh giá trong tất cả các lò mổ;
- m. Việc đánh giá phải dựa trên kiến thức khoa học và pháp luật; cơ quan kiểm tra có thẩm quyền có thể tham khảo các khía cạnh kinh tế và các nhu cầu về hoàn hảo, sao cho các đánh giá không ảnh hưởng tới nhu cầu tiêu thụ;
- n. Các tiêu chuẩn đánh giá trong tiêu chuẩn này đối với thịt đã qua kiểm tra sau khi giết mổ không được coi như một xếp hạng cuối cùng mà nên sử dụng một cách hợp lý để thích ứng với các tình huống khác nhau và khung luật pháp khác nhau;
- o. Các cơ quan kiểm tra có thẩm quyền phải tạo điều kiện cho các cơ quan khác sử dụng các kết quả của kiểm tra thịt để nâng cao sức khỏe cho người và động vật.

CHƯƠNG 3 : ĐỊNH NGHĨA

Các định nghĩa trong tiêu chuẩn này được hiểu như sau:

1. Lò mổ (Abattoir) là cơ sở được cơ quan kiểm tra công nhận và cho đăng ký, tại đó động vật được giết mổ để làm thực phẩm cho người.
2. Thịt được công nhận thích hợp làm thực phẩm cho người là tất cả thịt đã qua kiểm tra và được công nhận là không có bất cứ sự hạn chế nào, và vì vậy được đóng dấu (đánh giá bằng ký hiệu A)
3. Thịt được công nhận thích hợp làm thực phẩm cho người với hạn chế phân phối ở những khu vực nhất định là thịt được kiểm tra và công nhận làm thực phẩm cho người với yêu cầu là việc phân phối tiêu thụ được giới hạn ở những khu vực nhất định vì lý do bảo vệ sức khỏe động vật (đánh giá bằng ký hiệu L).
4. Dấu đóng (Brand) là dấu hiệu, nhãn được cơ quan kiểm tra có thẩm quyền chấp thuận và cả mác nhãn hiệu có dấu đó.

5. Thân thịt (Carcase) là thân của động vật giết mổ sau đã lấy tiết, pha lọc bỏ phủ tạng
6. Làm sạch (cleaning) là loại bỏ các chất bẩn
7. Động vật và thịt loại bỏ (Condemned) đối với động vật giết mổ hoặc thịt đã được kiểm tra và đánh giá, là chính thức không thích hợp để làm thực phẩm cho người, yêu cầu loại bỏ. Loại bỏ hoàn toàn là tất cả thân thịt và phụ phẩm phải loại bỏ (ký hiệu T). Loại bỏ một phần là loại bỏ từng phần của động vật giết mổ trong khi đó các phần khác được đánh giá ngược lại (ký hiệu D đối với các phần bị bệnh hoặc hư hỏng).
8. Thịt được công nhận thích hợp có điều kiện làm thực phẩm cho người là thịt đã qua kiểm tra và công nhận cho người sử dụng với điều kiện chúng phải được xử lý dưới sự giám sát chính thức để đảm bảo an toàn cho người sử dụng và tránh nguy hiểm cho sức khỏe động vật trước khi được đóng dấu và tiêu thụ (ký hiệu K).
9. Sự nhiễm bẩn (Contamination) là các chất bẩn bao gồm các chất bám và/ hoặc vi sinh vật làm cho thịt không an toàn hoặc không được hoàn hảo.
10. Cơ quan kiểm tra có thẩm quyền (Controlling authority) là cơ quan chính thức của Nhà nước làm việc kiểm tra vệ sinh thịt, bao gồm cả khám thịt.
11. Bệnh hoặc khuyết tật (Disease or defective) là các biến đổi bệnh lý hoặc các hiện tượng bất thường khác.
12. Thịt bị bệnh hoặc bị khuyết tật (Diseased or defective) là
 - a. Liên quan tới các cơ quan của động vật, một hoặc nhiều các cơ quan mà có các thay đổi bệnh lý hoặc bất thường được tìm thấy.
 - b. Liên quan tới các phần của cơ quan mà các phần của cơ quan này có các thay đổi bệnh lý hoặc bất thường được tìm thấy nhưng có thể tách riêng khỏi các phần khác của cơ quan không bị ảnh hưởng và
 - c. Liên quan tới các phần của thân thịt mà các phần của thân thịt này có các biến đổi bệnh lý hoặc bất thường được tìm thấy nhưng có thể tách riêng khỏi các phần khác của thân thịt không bị ảnh hưởng.
13. Pha lọc (Dressing) là sự tách rời từng phần được tiến hành từ lò mổ để chuyển từ động vật giết mổ thành thân thịt (hoặc một nửa thân thịt) phụ phẩm ăn được và các phụ phẩm không ăn được, có thể bao gồm cả việc cắt bỏ đầu. Thí dụ việc pha lọc bao gồm là cắt bỏ đầu, lột da, các cơ quan sinh dục, bóng đái, chân, và vú ở các động vật đang cho sữa.
14. Phụ phẩm ăn được: Liên quan đến động vật giết mổ (Edible offal) là các phụ phẩm được công nhận thực phẩm cho người.
15. Giết mổ khẩn cấp (Emergency slaughter) là giết mổ động vật cần thiết khi:
 - a) Đang bị chấn thương và đau đớn
 - b) Bị ảnh hưởng bởi các điều kiện mà không chấp nhận một phần hoặc chấp nhận có điều kiện làm thực phẩm cho người nhưng nguy cơ sẽ trầm trọng thêm nếu không giết mổ ngay.
16. Cơ sở chế biến (Establishment) là bất kỳ khu nhà nào khác mà không phải là lò mổ, khu nhà trên được cơ quan kiểm tra có thẩm quyền công nhận và cho đăng ký để chuẩn bị pha lọc, đóng gói và bảo quản thịt tươi.
17. Thịt thích hợp làm thực phẩm cho người (Fit for human consumption) là thịt được công nhận là an toàn và hoàn hảo bởi kiểm tra viên đã kiểm tra trừ khi thấy không hợp vệ sinh trong các kiểm tra tiếp theo, kể cả kiểm tra phòng thí nghiệm.
18. Thịt tươi (Fresh meat) là thịt chưa hề qua bất kỳ hình thức xử lý nào ngoài việc đóng gói bình thường hoặc đóng gói chân không để bảo quản, kể cả thịt được ướp lạnh vẫn được coi là thịt tươi trong tiêu chuẩn này.

19. Thịt không ăn được (Inedible) là thịt sau khi được kiểm tra và đánh giá, hoặc chính thức xác nhận là không thích hợp làm thực phẩm cho người nhưng không yêu cầu hủy bỏ.
20. Kiểm tra viên (inspector) là các cán bộ được đào tạo đầy đủ do cơ quan kiểm tra có thẩm quyền cử để kiểm tra thịt và kiểm tra vệ sinh, họ có thể là một thanh tra thú y. Việc giám sát vệ sinh thịt bao gồm cả khám thịt phải là trách nhiệm của kiểm tra viên thú y.
21. Người quản lý (Manager) lò mổ hoặc cơ sở chế biến là một người hiện đang chịu trách nhiệm quản lý lò mổ hay cơ sở chế biến.
22. Thịt (Meat) là tất cả các phần ăn được của động vật được giết mổ tại lò mổ bao gồm cả các phụ phẩm ăn được.
23. Phụ phẩm (offal) liên quan đến động vật giết mổ là phần ăn được và không ăn được của động vật ngoài thân thịt.
24. Nước uống được (Potable water) là nước sạch, hợp vệ sinh vào thời điểm sử dụng, phù hợp các yêu cầu theo quy định của WHO về chất lượng nước uống.
25. Quần áo bảo hộ (Protective clothing) là quần áo đặc biệt để tránh gây ô nhiễm cho thịt và được dùng cho người làm việc tại lò mổ hoặc cơ sở chế biến để mặc ngoài, bao gồm cả mũ và ủng.
26. Chất tồn dư (Residues) là sự tồn dư thuốc thú y, chất trừ sinh vật hại và các chất gây nhiễm bẩn khác đã được định nghĩa trong thực phẩm của Codex⁷⁾.
27. Tạm giữ lại (Retained) là được giữ lại dưới sự kiểm tra và bảo vệ của cơ quan kiểm tra có thẩm quyền để chờ ý kiến đánh giá cuối cùng.
28. Phân tích rủi ro (Risk analysis) bao gồm đánh giá mức rủi ro, việc quản lý rủi ro và thông tin các rủi ro, các yếu tố này là rất quan trọng trong việc đưa các mức rủi ro có thể chấp nhận được và cách áp dụng các quyết định đó.
29. Thịt an toàn hoàn hảo (Safe and wholesome) đối với thịt đã được công nhận hợp cho người sử dụng trong đó đề cập đến các chỉ tiêu sau:
 - a. Không gây bệnh truyền nhiễm hoặc ngộ độc thức ăn trong quá trình chế biến hoặc tùy theo mục đích sử dụng;
 - b. Không có các chất tồn dư vượt giới hạn theo quy định của Codex;

⁷⁾ Những định nghĩa của codex thực phẩm như sau (xem tập 1, trang 11-13)

Thuốc thú y: Tất cả các chất dùng hay điều trị cho vật nuôi như các gia súc cho thịt, cho sữa, gia cầm, cá hay ong dừ chỉ sử dụng nó với mục đích điều trị, phòng và chẩn đoán hay nhằm biến đổi chức năng sinh lý hay tập tính.

Chất tồn dư thú y: Những chất gốc và/hoặc chất chuyển hoá ở tất cả các phần ăn được của sản phẩm nguồn gốc động vật cũng như chất tồn dư của các tạp chất gắn với thuốc thú y.

Chất trừ sinh vật hại: Tất cả các chất dùng để ngăn ngừa, phá huỷ chất hấp dẫn côn trùng, xua đuổi côn trùng nảy nở hay chống lại tất cả các yếu tố có hại, bao gồm tất cả các loài không có lợi cho thực vật hoặc côn trùng trong quá trình sản xuất, bảo quản, vận chuyển, phân phối và chế biến nông sản hay thức ăn động vật hoặc được dùng cho động vật để loại bỏ ngoại ký sinh. Chữ này bao gồm các chất sử dụng như chất điều hoà sinh trưởng thực vật, làm rụng lá, làm khô, tác nhân ra hoa hay ức chế nảy mầm cũng như các chất dùng trong trồng trọt trước và sau khi thu hoạch để bảo vệ sản phẩm chống lại tất cả những bất lợi trong dự trữ và vận chuyển. Chữ này không bao gồm phân bón, những yếu tố dinh dưỡng dành cho thực vật và động vật, chất bổ sung và thuốc thú y.

Dư lượng của chất trừ sinh vật hại: Tất cả các chất xác định có mặt trong thực phẩm, nông sản hay sản phẩm làm thức ăn chăn nuôi sau khi sử dụng thuốc bảo vệ thực vật. Chữ này cũng bao gồm tất cả dẫn chất của chất trừ sinh vật hại như các sản phẩm chuyển đổi hay sản phẩm sinh ra trong phản ứng các chất chuyển hoá và những tạp chất được coi có tầm quan trọng về mặt độc hại.

Chất gây nhiễm bẩn: Tất cả chất không chủ tâm thêm vào thức ăn nhưng có mặt như một chất tồn dư trong quá trình sản xuất (bao gồm cả quá trình xử lý đối với cây trồng và gia súc và cả quá trình chăm sóc thú y), chế tạo, chế biến, xử lý, trình bày, bao gói, vận chuyển hay dự trữ hay gây nhiễm bẩn môi trường. Từ này không áp dụng cho mảnh xác côn trùng, lông loài gặm nhấm và những chất lạ khác.

- c. Không có sự nhiễm bẩn rõ ràng;
- d. Không có các khuyết tật mà người tiêu thụ chấp nhận được;
- e. Được sản xuất dưới sự kiểm tra vệ sinh đầy đủ;
- f. Không qua xử lý bằng các chất bị cấm đã ghi trong qui định pháp luật quốc gia.

- 30. Giết mổ (Slaughter) là giết động vật làm thực phẩm cho người bao gồm cả lấy tiết ra.
- 31. Động vật giết mổ (Slaughter animal) là động vật được đưa hợp pháp vào lò mổ để giết mổ.
- 32. Kiểm tra viên thú y (Veterinary inspector) là người có chuyên môn về thú y.
- 33. Phũ tạng (Viscera) là các cơ quan của khoang ngực và khoang bụng bao gồm cả thận.

CHƯƠNG 4: KIỂM TRA TRƯỚC KHI GIẾT MỔ

Tình trạng ban hành của trại chăn nuôi và phương pháp chăn nuôi động vật giết mổ có tác động rất lớn đối với sự an toàn và tính hoàn hảo của thịt. Về mặt này phải tập trung cố gắng để thu thập và đánh giá các thông tin có ảnh hưởng tới việc kiểm tra trước và sau khi giết mổ.

Việc kiểm tra trước khi giết mổ phải được thực hiện một có cách hệ thống, phù hợp với các thủ tục thông thường do cơ quan kiểm tra có thẩm quyền quy định. Phải đảm bảo loại trừ khỏi dây chuyền sản xuất những động vật bị bệnh, bị khuyết tật mà thịt của chúng không làm thực phẩm cho người.

Việc kiểm tra trước khi giết mổ phải đảm bảo rằng những động vật mà thịt của chúng có thể làm thực phẩm cho người nhưng đòi hỏi phải có những xử lý đặc biệt trong quá trình giết mổ và pha lọc hoặc yêu cầu một kiểm tra đặc biệt sau khi giết mổ, những động vật này phải được tách riêng và sau đó phải được quản lý hay kiểm tra.

Những hệ thống đầy đủ để nhận biết động vật và các hệ thống lưu giữ hồ sơ là rất thiết yếu nếu muốn người ta sử dụng đầy đủ các thông tin ngay từ nơi chăn nuôi để kiểm tra trước và sau khi giết mổ. Việc thu thập số liệu và hệ thống ghi chép phải phản ánh chính xác tình hình dịch bệnh tại nơi chăn nuôi và cho phép phân tích dịch tễ học nghiêm túc.

Hơn nữa, việc thu thập số liệu và hệ thống ghi chép phải có khả năng đáp ứng các thay đổi về tình trạng sức khỏe của nhân dân và của động vật tại địa phương hay tại vùng.

Một trong những chức năng quan trọng nhất của việc kiểm tra trước khi mổ là đảm bảo động vật được nghỉ ngơi đầy đủ để những dấu hiệu quan trọng ở động vật không bị che dấu khi kiểm tra. Cũng cần đảm bảo những dấu hiệu quan trọng trong sử dụng khi kiểm tra, có nguy cơ không nhận ra ở lúc kiểm tra sau khi giết mổ, sẽ được xem xét khi đi tới quyết định về sự an toàn và tính hoàn hảo của thịt.

Trong quá trình kiểm tra trước khi giết mổ nếu thấy động vật không đạt yêu cầu giết mổ làm thực phẩm cho người thì quyết định đánh giá phải căn cứ vào những kết quả đó và không được để chậm lại cho tới khi giết mổ và kiểm tra sau khi giết mổ.

Trong trường hợp kiểm tra trước khi giết mổ những động vật cần có các yêu cầu xử lý đặc biệt ở nơi giết mổ và nơi pha lọc (do quá béo, bệnh tật hoặc khuyết tật) phải được phân biệt và quản lý đặc biệt đồng thời phải đóng dấu để kiểm tra kỹ hơn sau khi giết mổ.

- 34. Các thông tin có được từ trại nuôi phải được sử dụng một cách hữu hiệu và phù hợp nhằm đạt được hiệu quả tốt nhất trong kiểm tra trước và sau khi giết mổ.

35. Không được đưa động vật vào giết mổ khi người kiểm tra chưa thực hiện xong việc kiểm tra trước khi giết mổ và công nhận đủ tiêu chuẩn để đưa vào giết mổ.
- Trong các trường hợp giết mổ khẩn cấp, có thể có ngoại lệ, vì chậm trễ trong quá trình kiểm tra trước khi giết mổ có thể dẫn đến động vật có những đau đớn quá mức.
36. Động vật khi đưa đến lò mổ phải được kiểm tra viên kiểm tra càng sớm càng tốt. Nếu động vật giữ lâu quá 24 giờ sau lần khám đầu tiên, thì việc khám trước khi giết mổ phải lập lại để đảm bảo việc khám đó chỉ diễn ra trong vòng 24 giờ trước khi giết mổ.
37. Phải phân biệt động vật đã được kiểm tra và xác định cùng với kết quả kiểm tra trước khi giết mổ bằng phương pháp mà cơ quan kiểm tra có thẩm quyền chấp nhận.
38. Người quản lý phải cung cấp mọi trợ giúp cần thiết đảm bảo cho việc kiểm tra trước khi giết mổ được thực hiện đầy đủ.
39. Việc kiểm tra trước khi giết mổ phải được thực hiện với tất cả sự hiểu biết về các thông tin thu thập được trên con vật trước khi chúng được đưa đến lò mổ.
40. Động vật phải được kiểm tra bằng cách để kiểm tra viên có thể phát hiện ra mọi sai lệch so với bình thường, liệu các biểu hiện ở thái độ, hành vi, vẻ bên ngoài hoặc các triệu chứng lâm sàng khác có thể chỉ ra các bệnh tật, khuyết tật đòi hỏi phải xử lý đặc biệt hoặc phải kiểm tra kỹ hơn hoặc không. Kiểm tra viên cũng cần có ý kiến về độ sạch của động vật để quyết định cho việc giết mổ.
41. Kiểm tra viên đang kiểm tra sau khi giết mổ phải ghi nhận một cách hệ thống các kết quả kiểm tra trước khi giết mổ.
42. Động vật được đưa vào giết mổ không hạn chế nếu kết quả kiểm tra trước khi giết mổ thấy rằng chúng đã được nghỉ ngơi đầy đủ, không mắc bệnh hoặc khuyết tật nào mà không thích hợp làm thực phẩm cho người hoặc đòi hỏi những chú ý đặc biệt trong quá trình pha lọc hoặc kiểm tra sau khi giết mổ, và động vật không bị quá bẩn.
43. Nếu trong quá trình kiểm tra trước khi giết mổ mà một bệnh hoặc một khuyết tật nào đó được phát hiện mà động vật đó không bị cấm giết mổ làm thực phẩm cho người nhưng lại có thể gây ảnh hưởng tới kết quả kiểm tra hoặc đánh giá sau giết mổ thì động vật đó phải được đánh dấu để kiểm tra viên thú y cho phép giết mổ và kiểm tra sau khi giết mổ.
44. Nếu một con vật có những dấu hiệu nghi ngờ bệnh thì con vật đó phải được tách riêng khỏi dây chuyền bình thường, đưa vào nơi cách ly bên cạnh để:
- Kiểm tra kỹ hơn, quan sát hay xử lý hoặc
 - Giết mổ với điều kiện đặc biệt để loại trừ khả năng gây nhiễm cho nhà mổ, thiết bị và người.
45. Nếu các dấu hiệu bệnh tật cho thấy có tổn thương hệ thống có thể lây sang người, hay chất có độc có từ hoá chất hoặc các tác nhân sinh học làm cho thịt không an toàn thì những động vật này phải:
- Thải loại tức thì khi thích hợp làm thực phẩm cho người
 - Hoặc nếu có thể thì tách riêng và đặt dưới sự theo dõi của người kiểm tra cho tới khi có các quyết định xử lý tiếp theo.
46. Nếu động vật có biểu hiện bình thường nhưng được biết có mang chất tồn dư thì hoặc phải loại bỏ hoặc giữ lại cho đến khi chất tồn dư được thải ra hoặc chuyển hoá tới mức không cao hơn mức quy định. Trong trường hợp nghi ngờ, động vật phải được tách riêng, giết mổ riêng sau đó thân thịt và phủ tạng phải được xét nghiệm đầy đủ tại phòng thí nghiệm.
47. Bất kỳ động vật nào không đủ điều kiện đưa ra giết mổ ở lần khám trước khi giết mổ thì phải được kiểm tra viên thú y kiểm tra lại để có quyết định cuối cùng về cách sử dụng.

48. Những gì sót lại của động vật bị chết hoặc phải bị huỷ bỏ theo kết luận của kiểm tra trước khi giết mổ thì phải được dọn đi tới nơi tiêu huỷ, đồng thời phải áp dụng các biện pháp phòng ngừa việc sử dụng trái phép, để tránh nguy hiểm cho sức khoẻ của người và động vật. Trừ phi nguyên nhân chết của động vật đó đã được biết, nên tiến hành mổ khám sau khi chết để xác định bệnh và đáp ứng các yêu cầu giám sát bệnh của người và động vật.

CHƯƠNG 5 : KIỂM TRA SAU KHI GIẾT MỔ

Việc kiểm tra sau khi giết mổ phải được tiến hành một cách có hệ thống sao cho thịt khi làm thực phẩm cho người phải an toàn và hoàn hảo.

Thủ tục kiểm tra phải đảm bảo không có bất cứ chất nhiễm bẩn nào không phát hiện được trong việc kiểm tra sau khi giết mổ và hạn chế sự nhiễm bẩn không nhìn thấy ở mức thấp nhất.

Trong quá trình kiểm tra sau khi giết mổ, kiểm tra viên phải có các thông tin có được từ trại nuôi và từ kiểm tra trước khi giết mổ với những gì thấy được khi kiểm tra đầu, thân thịt và phủ tạng. Khi chưa có thể quyết định ngay là có thể dùng cho người được hay không thì thân thịt và phủ tạng phải tạm để lại và được canh giữ cẩn thận để kiểm tra tiếp. Việc kiểm tra sau khi giết mổ phải đầy đủ và hữu hiệu bao gồm các thủ tục cho từng bối cảnh cụ thể. Để làm được việc này một cách đầy đủ phải có những phương pháp phân tích chính thức về rủi ro. Giám sát cách gây choáng và chọc tiết sao cho con vật không bị đau và thực hành vệ sinh phải được tôn trọng.

49. Kiểm tra sau khi giết mổ phải được thực hiện ngay sau khi pha lóc và không được trì hoãn.
50. Khi cắt rạch các hạch lâm ba, các cơ quan hoặc các tổ chức của thân thịt để kiểm tra thì mặt cắt phải gọn, sạch để nhìn rõ không bị mờ, bẩn. Những nơi buộc phải cắt, rạch để kiểm tra thì phải rạch sao cho ít có nguy cơ gây nhiễm bẩn cho thịt, nhà xương, thiết bị và con người.
51. Đầu, các cơ quan, phủ tạng và các bộ phận khác của thân thịt đòi hỏi được kiểm tra sau khi giết mổ phải được nhận biết cùng với thân thịt của cùng con vật đó cho đến khi kiểm tra xong. Nếu máu định dùng làm thực phẩm cho người thì phải được giữ riêng để xác định được là máu của con vật đó cho đến khi kiểm tra xong thân thịt, để nếu cần thiết thì có thể huỷ bỏ được.
52. Không ai được phép mang thân thịt, phần của thân thịt, các cơ quan nội tạng ra khỏi khu kiểm tra (trừ những thứ không dùng cho người hay động vật và không phải kiểm tra) cho đến khi kiểm tra viên đã được hoàn thành việc kiểm tra và ra quyết định.
53. Trừ phi kiểm tra viên cho phép hoặc theo thoả thuận đã được xác lập cùng cơ quan kiểm tra có thẩm quyền đối với một số loại khuyết tật nhất định thì khi chưa kiểm tra xong, không ai được phép:
- Bóc màng niêm mạc hoặc lấy đi bất kỳ bộ phận nào từ thân thịt;
 - Lấy đi, làm thay đổi, hoặc che dấu các dấu vết của dịch bệnh, khuyết tật trên thân thịt hay một cơ quan, hoặc
 - Lấy đi bất kỳ một dấu hiệu phân biệt nào khỏi da, thân thịt, đầu hay phủ tạng

Cho đến khi kiểm tra viên đã hoàn thành kiểm tra và ra quyết định.

54. Khi kiểm tra đầu phải lột da tới mức đủ để kiểm tra và đầu phải sạch sẽ. Phải cắt rời cuống lưỡi để cho phép kiểm tra cơ nhai hoặc hạch lâm ba. Những nơi dùng móc để treo đầu để kiểm tra thì có thể cắt rời lưỡi rồi sau đó mới rạch hạch lâm ba để kiểm tra.
55. Bất kỳ thân thịt hoặc phủ tạng nào có nghi ngờ cần kiểm tra kỹ hơn, thì phải có cách đánh dấu và tách riêng để theo dõi. Những phần cần thiết của thân thịt phải được tập hợp lại để kiểm tra tiếp theo. Việc kiểm tra này hoặc các xét nghiệm tiếp theo khác nếu được kiểm tra viên thú y coi là cần thiết thì bắt buộc phải tiến hành.

56. Các phương pháp đánh dấu thân thịt hoặc phủ tạng phải giữ lại kiểm tra tiếp phải do cơ quan kiểm tra có thẩm quyền quy định.
57. Trách nhiệm cuối cùng về kết quả kiểm tra thịt có thích hợp làm thực phẩm cho người hay không thuộc về kiểm tra viên thú y.

CHƯƠNG 6 : PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA SAU KHI GIẾT MỔ

Cơ quan kiểm tra có thẩm quyền phải xây dựng qui trình thường xuyên cần cho việc kiểm soát từng mô và từng cơ quan phủ tạng. Các qui trình diễn tả trong tiêu chuẩn này là một hướng dẫn cho các yêu cầu khi kiểm tra.

Kiểm tra viên phải tiến hành các quy trình kiểm tra bổ sung khi cần thiết trong trường hợp nghi vấn có bệnh hoặc khuyết tật, và được trang bị đầy đủ các phương tiện cho công việc này.

Các mô và cơ quan phủ tạng không dùng làm thực phẩm cho người phải được kiểm tra nhằm toàn bộ sự đánh giá và dự kiến được mục đích sử dụng thân thịt và các phần khác. Các phương pháp kiểm tra bổ sung có thể tiến hành định kỳ để kiểm tra những bệnh có thể bất ngờ xảy ra đối với động vật nuôi thịt.

Các qui trình kiểm tra sau giết mổ trình bày trong các bảng A, B và C của tiêu chuẩn này được lập ra trên cơ sở thực hành và hiểu biết thông dụng và là bản hướng dẫn kiểm tra giết mổ cần phải thực hiện trừ trường hợp có yêu cầu cụ thể khác đã được xây dựng trên cơ sở phân tích tính chất hạn chế của các qui trình đó. Tham gia phân tích hạn chế của các qui trình kiểm tra giết mổ rất đáng khuyến khích và nó cho phép phát triển các quy trình khác phản ánh đúng sự tiến bộ của khoa học về kiểm tra giết mổ và tình trạng sức khỏe của đàn gia súc được kiểm tra. Chỉ khi nào các qui trình chính xác và đầy đủ nhất được áp dụng trong kiểm tra sau khi giết mổ, để phát hiện bệnh hoặc khuyết tật có thể có trong đàn gia súc, thì việc kiểm tra sau giết mổ mới được coi là tối ưu. Các qui trình phù hợp nhất, áp dụng cho bất kỳ dòng động vật nào, qui trình đó cũng thay đổi không những tùy theo loài mà còn tùy theo các yếu tố khác như hệ thống chăn nuôi, hệ thống xử lý, và các phương thức khác đã được áp dụng, tuổi gia súc, và trạng thái sức khỏe của gia súc trong khu vực chúng được nuôi dưỡng hoặc quá cảnh.

Khi xem xét các bảng kiểm tra sau khi giết mổ ghi trong tiêu chuẩn này, điều quan trọng cần đánh giá là chúng chỉ là các bảng hướng dẫn các yêu cầu (trừ trường hợp yêu cầu cụ thể khác đã được xây dựng sau khi phân tích các rủi ro), và các qui trình kiểm tra thêm cần phải thực hiện khi cần thiết làm sáng tỏ một vấn đề hoặc nghi ngờ có vấn đề. Trong các bảng nói trên, các từ "sờ nắn" và "rạch" phải được hiểu rõ là có kèm theo kiểm tra bằng thị giác trong trường hợp có thể làm được.

58. Một bản hướng dẫn các qui trình phải thực hiện để kiểm tra sau khi giết mổ được trình bày trong các bảng A, B và C của tiêu chuẩn này. Các yêu cầu khác về kiểm tra sau khi giết mổ không trình bày trong các bảng đó bao gồm:
 - a. Động vật nghi là có mắc bệnh toàn thân hay một hệ thống nào đó, động vật dương tính với tuberculin, động vật có bệch tích nghi mắc lao khi kiểm tra sau khi giết mổ, ngựa dương tính khi thử malein, tất cả các hạch lâm ba trong thân thịt (trước vai, khoeo, trực tràng, hạch bẹn nông, hạch xương chậu. Hạch móng trong và ngoài, lưng, thận, ức, trước ngực, trước vai, sau gáy) cũng như các hạch lâm ba vùng đầu và của phủ tạng phải được rạch và kiểm tra.
 - b. Bầu vú và phổi nếu làm thực phẩm cho người phải được kiểm tra bằng cách rạch
 - c. Mô và cơ quan loại bỏ theo tập quán thông thường nếu làm thực phẩm cho người phải được kiểm tra thỏa đáng.

- d. Trừ bê dưới sáu tuần tuổi, thực phẩm của bò và bê phải được tách ra khỏi khí quản và được khám xét.
 - e. Phân kiểm tra bệnh gạo bò (*Cysticercus bovis*) ở bò và bê trên sáu tuần tuổi, các cơ nhai phải được xem xét và một hoặc nhiều đường rạch song song ở hàm dưới bên trong cơ nhai trong và cơ nhai ngoài.
 - f. Tim của bò và bê trên sáu tuần tuổi phải được kiểm tra kỹ bệnh gạo bò (*Cysticercus bovis*) bằng cách hoặc rạch một hoặc nhiều đường từ đỉnh xuống đáy tim hoặc rạch lộn van và cơ tim ra ngoài để khám xét-việc kiểm tra tim này phải áp dụng cho cả bê dưới sáu tuần tuổi nuôi trong khu vực thường thấy có bệnh gạo bò (*Cysticercus bovis*) mà kiểm tra sau khi giết mổ tim thấy.
 - g. Đầu phải bóc dọc đôi theo đường giữa và các vách mũi của tất cả ở ngựa vùng mắc bệnh ty thư thì phải được kiểm tra.
 - h. Các cơ và các hạch lâm ba nằm dưới sụn thuộc xương bả vai (*lymphonodi sub-rhomboidei*) của tất cả ngựa trắng và ngựa xám thì phải được kiểm tra u sắc tố sau khi tháo vai ngựa.
 - i. Khi có nguy cơ bệnh gạo lợn (*Cysticercus cellulosae*), thì cơ hàm ngoài, cơ bụng, cơ hoành và gốc lưỡi lợn phải được cắt ra, miếng cắt mỏng của lưỡi lợn phải được sờ nắn và xem kỹ
 - k. Tim của tất cả lợn thuộc vùng nghi có bệnh gạo lợn (*Cysticercus cellulosae*) phải được mở ra và rạch sâu vào vách ngăn.
59. Các nước phải có biện pháp có hiệu lực trong hệ thống kiểm tra thịt để bảo vệ nhân dân tránh bệnh giun bao (*trichinosis*).

CHƯƠNG 7: ĐÁNH GIÁ KIỂM TRA GIẾT MỔ VÀ HIỆU LỰC THI HÀNH

Quá trình đánh giá kiểm tra giết mổ bắt đầu từ khi nhập động vật vào lò mổ và thông thường kết thúc sau khi xong kiểm tra sau khi giết mổ. Kiểm tra viên đánh giá và đưa ra kết luận động vật có thích hợp để giết mổ làm thực phẩm cho người, và sáu loại thịt lấy ra từ động vật giết mổ sẽ được xếp loại. Thịt có thể được đánh giá như sau:

- a. An toàn vô điều kiện và hoàn hảo thích hợp làm thực phẩm cho người
- b. Hoàn toàn không thích hợp làm thực phẩm cho người và do vậy cần phải xử lý : khi không có cách loại bỏ nào khác; nếu không thích hợp làm thực phẩm cho người, phải quyết định dùng thịt cho mục đích khác hoặc tiêu hủy.
- c. Một phần không thích hợp làm thực phẩm cho người, phần đó cần cắt riêng ra hoặc loại bỏ trước khi phần còn lại được cho phép dùng làm thực phẩm cho người; quyết định tiếp theo là phần cắt bỏ do không thích hợp dùng làm thực phẩm cho người, có thể dùng vào mục đích khác hoặc tiêu hủy.
- d. Thích hợp có điều kiện, trong trường hợp này đưa ra biện pháp xử lý cần thiết để làm cho thịt an toàn và vệ sinh.
- e. Thích hợp làm thực phẩm cho người mặc dù có một vài nhược điểm và thông thường được coi là hoàn hảo; các nhược điểm thường thuộc về khuyết tật thuộc một loại nào đó mà cơ quan kiểm tra có thẩm quyền chấp nhận được hoặc
- f. Thích hợp làm thực phẩm cho người nhưng chỉ được lưu thông trong một khu vực địa lý hạn chế nhằm tránh làm lây lan bệnh gia súc.

Đánh giá nhằm mục đích bảo vệ:

- a. Người tiêu dùng tránh được các bệnh do thực phẩm gây ra, ngộ độc, và nguy hại liên quan đến các chất tồn dư.
 - b. Người làm về thịt tránh các bệnh nghề nghiệp chung giữa người và động vật
 - c. Đàn gia súc tránh nhiễm khỏi sự lây lan bệnh truyền nhiễm, ngộ độc, và các bệnh khác có tầm quan trọng kinh tế xã hội; đặc biệt quan trọng các bệnh trong danh sách công bố dịch, các bệnh đang chính thức nằm trong các chương trình phòng chống cấp quốc gia, khuyết tật di truyền, độc tố có nguồn gốc thức ăn hoặc môi trường.
 - d. Chim thú cảnh hoặc các động vật chung sống gần gũi với con người và quần thể động vật hoang dã; chống các bệnh chung giữa người và động vật có thể lây sang người, và
 - e. Người tiêu dùng (và một cách gián tiếp công nghệ chế biến thịt) tránh thiệt hại về kinh tế do thịt có tiêu chuẩn thấp hoặc có đặc tính không bình thường.
60. Đề cập đến các bệnh, bệnh nhiễm trùng hoặc khuyết tật quan sát thấy, đánh giá cuối cùng phù hợp với các vấn đề nêu trên phải dựa vào các bằng chứng như giấy chứng nhận sổ ghi chép của trại nuôi, các quan sát thấy được trong khi nuôi, các phát hiện khi kiểm tra trước và sau khi giết mổ và bất kỳ kết quả xét nghiệm nào trong phòng thí nghiệm mà có thể được yêu cầu.
 61. Trong trường hợp nghi ngờ mà các quan sát thấy được khi kiểm tra trước và hoặc sau giết mổ không đủ cho phép đánh giá cuối cùng thì phải đưa ra quyết định tạm thời. Khi chưa có đánh giá cuối cùng, thịt phải được "giữ lại để kiểm tra thêm" hoặc giữ lại chờ kết quả phòng xét nghiệm dưới sự giám sát của kiểm tra viên giết mổ cho đến khi có thông tin đầy đủ cho phép có đánh giá cuối cùng. Nếu các xét nghiệm thêm, hoặc các xét nghiệm thêm không được tiến hành, hoặc không thể tiến hành được và sự nghi ngờ không thể làm sáng tỏ được bằng bất kỳ phương pháp nào khác thịt cần được huỷ bỏ hoặc dành cho những đánh giá khác sau khi xác nhận bệnh hay khuyết tật có nghi ngờ.
 62. Thịt thích hợp có điều kiện làm thực phẩm cho người phải được kiểm tra viên thú y hoặc người ủy quyền của kiểm tra viên thú y giám sát cho đến khi các biện pháp xử lý được thực hiện xong. Thịt phải được xử lý hoặc loại bỏ nếu yêu cầu xử lý không được chấp hành.
 63. Đánh giá phải dựa vào pháp luật hiện hành do cơ quan kiểm tra có thẩm quyền quản lý. Đánh giá nhằm bảo vệ sức khoẻ người và gia súc, không được áp đặt các chi phí không cần thiết cho công nghiệp.
 64. Điều quan trọng là đánh giá của điều tra viên giết mổ được pháp luật bảo hộ và nhà nước đền bù thiệt hại do các quyết định trung thực gây ra.
 65. Cơ quan kiểm tra có thẩm quyền phải chịu trách nhiệm trước tiên về mọi quyết định liên quan đến việc cho phép đưa gia súc vào lò mổ và mọi đánh giá về kiểm tra trước và sau khi giết mổ.
 66. Nếu các quyết định của cơ quan có thẩm quyền bị khiếu nại, cần áp dụng luật trọng tài của nhà nước. Tuy vậy, việc khiếu nại về một quyết định nào đó không được làm chậm lại các hoạt động của cơ quan kiểm tra có thẩm quyền thấy rằng việc chậm trễ này gây tổn hại sức khoẻ người và gia súc.

CHƯƠNG 8: ĐÁNH GIÁ TRƯỚC VÀ SAU KHI GIẾT MỔ

Đánh giá chấp nhận đưa gia súc vào lò mổ

67. Khi cá thể hoặc một đàn động vật được đưa đến lò mổ, phải quyết định là chúng được chấp nhận hay không một cách nhanh nhất mà thực tế cho phép. Động vật có bệnh hoặc khuyết tật phải được kiểm tra viên thú y đánh giá và đưa ra một trong các đánh giá sau:

- a. Không chấp nhận (việc xử lý đàn gia súc tiếp sau đánh giá này phải được tiến hành theo quy định của pháp luật về chống dịch – nếu hoàn cảnh thực tế thấy rằng việc đưa đi hoặc giữ lại trong khu vực cách li đều gây ra nguy hiểm cho sức khỏe của người và động vật, đàn gia súc phải được chấp nhận cho giết mổ với những điều kiện vệ sinh đặc biệt hoặc tiêu huỷ một cách thích hợp, nhưng không được phép đưa động vật sống ra khỏi lò mổ một khi chúng đã vào khu vực này trừ trường hợp có sự đồng ý của cơ quan có thẩm quyền); hoặc.
 - b. Chấp nhận đưa vào lò mổ với điều kiện giám sát đặc biệt theo các quy định ghi trong mục 71.
68. Việc quyết định không chấp nhận đưa vào lò mổ một hay một đàn động vật do kiểm tra thú y đưa ra phải dựa trên những tiêu chuẩn và nguồn thông tin sau:
- a. Việc chấp nhận có nguy cơ gây ra bệnh truyền nhiễm cho người và động vật;
 - b. Những chứng chỉ gốc hoặc chứng chỉ sức khỏe cấp theo luật định không có hoặc không phù hợp;
 - c. Những quy định về sức khỏe động vật liên quan đến đường vận chuyển và phương tiện vận tải không được tôn trọng; hoặc
 - d. Giấy chứng nhận hoặc việc thông tin chính thức khác thấy rằng động vật được xử lý nhưng chưa qua hết thời gian quy định về tác dụng của thuốc hoặc chất độc trong khi thiếu phương tiện để cho phép giết mổ có giám sát đặc biệt cho đến khi hết thời gian quy định.
69. Việc quyết định cho phép giết mổ có giám sát đặc biệt đối với một hay đàn động vật thuộc trách nhiệm của kiểm tra viên thú y và quyết định này phải căn cứ vào các tiêu chuẩn hoặc nguồn tin sau đây:
- a) Động vật có xuất xứ từ vùng có dịch, hoặc khu vực vành đai, và được đưa đi giết mổ theo giấy phép đặc biệt trong đó ghi rõ chỉ định giết mổ và các biện pháp phòng ngừa thích hợp.
 - b) Khi có động vật ốm hoặc chết khiến có lý do để nghi có bệnh lây nhiễm, hoặc
 - c) Động vật đang trong thời gian chữa trị hoặc chịu tác động của chất độc mà thời hạn lại chưa đủ so với thời gian qui định.
- Đánh giá về kiểm tra trước khi giết mổ**
70. Một động vật được chấp nhận để giết mổ bình thường phải được phép đưa vào lò mổ không điều kiện khi việc kiểm tra trước khi giết mổ không phát hiện bất cứ dấu hiệu nào của bệnh tật khi con vật này đã được lưu lại và nghỉ ngơi đầy đủ.
71. Động vật được chấp nhận đưa vào lò mổ để giết không có bất kỳ một hạn chế nào phải được phân chia theo các loại sau tùy theo các tiêu chí dưới đây:
- a) Huỷ bỏ
 - (i) Nếu ở lúc kiểm tra trước khi giết mổ phát hiện một bệnh hoặc một khuyết tật khiến cho khi đánh giá cuối cùng có lý do để huỷ bỏ toàn bộ, nếu trở thành mối nguy hiểm không chấp nhận được cho sức khỏe của công nhân lò mổ, hoặc trở thành mối nguy hiểm không chấp nhận được vì làm lây lan ra lò mổ hoặc lây lan sang các thân thịt khác.
 - b) Được phép giết mổ trong các điều kiện đặc biệt (giết mổ trong một phòng riêng biệt hoặc trong một khu riêng biệt của lò mổ hoặc vào thời điểm giành riêng cho loài động vật này, vào thời điểm cuối ngày sau khi đã giết mổ các động vật khác hoặc vào một ngày riêng biệt);
 - (i) Nếu việc kiểm tra trước khi giết mổ nghi có bệnh hoặc khuyết tật để khi kiểm tra sau khi giết mổ có thể có lý do để huỷ bỏ toàn bộ; hoặc
 - (ii) Nếu việc kiểm tra trước khi giết mổ phát hiện hoặc nghi có bệnh hoặc khuyết tật và nếu khẳng định được phát hiện này khi kiểm tra sau giết mổ thì có lý do huỷ bỏ một phần hoặc chấp nhận có điều kiện.

c) Hoãn giết mổ:

(i) Nếu thời gian phục hồi chưa đầy đủ hoặc động vật bị giết mổ ở trạng thái tạm thời chưa thích hợp làm thực phẩm cho người với điều kiện động vật phải được chăm sóc nuôi dưỡng hợp vệ sinh trong thời gian cần thiết; hoặc

d) Giết mổ khẩn cấp:

(i) Nếu động vật ở trong một tình trạng không thích hợp có điều kiện để làm thực phẩm cho người, và tình trạng càng xấu đi nếu không giết mổ ngay; hoặc

(ii) Nếu do động vật mới bị vết thương do tai nạn, việc giết mổ ngay nhằm chấm dứt sự đau đớn cho con vật, hoặc để tránh cho chất lượng bị giảm đi của thịt thích hợp làm thực phẩm cho người.

72. Trong trường hợp hoãn giết mổ, động vật phải được nuôi cách ly theo quy định của cơ quan kiểm tra có thẩm quyền, và được kiểm tra theo phương pháp kiểm tra trước khi giết mổ theo từng thời gian thích hợp.

Đánh giá kiểm tra sau khi giết mổ

73. Các quyết định khi đánh giá kiểm tra sau khi giết mổ được phân loại sau:
1. Công nhận là thích hợp làm thực phẩm cho người
 2. Công nhận là hoàn toàn không thích hợp làm thực phẩm cho người
 3. Công nhận là một phần phải huỷ bỏ hoặc xử lý khác khi không thích hợp làm thực phẩm cho người
 4. Công nhận là thích hợp có điều kiện làm thực phẩm cho người
 5. Công nhận là thịt có một số nhược điểm nhỏ nhưng thích hợp dùng làm thực phẩm cho người
 6. Công nhận là thích hợp làm thực phẩm cho người nhưng hạn chế khu vực sử dụng.
74. Danh mục bệnh và khuyết tật hướng dẫn phân ra sáu loại thịt được kê trong mục 101. Các loại thịt không phải phân loại một cách cứng nhắc, và được dùng một cách linh hoạt sao cho phù hợp với tình hình cụ thể và khuôn khổ pháp lý khác nhau.
75. Sau đây là các tiêu chí và nguyên tắc chung thực hiện việc phân loại thịt khi đánh giá kiểm tra sau khi giết mổ:

Loại 1- Công nhận là thích hợp làm thực phẩm cho người

76. Khi kiểm tra sau khi giết mổ không phát hiện thấy có bằng chứng của bệnh hoặc khuyết tật quy định và quá trình giết mổ tuân theo yêu cầu vệ sinh, thân thịt và phần phụ ăn được được coi là thích hợp không kèm theo hạn chế nào để làm thực phẩm cho người và như vậy được tự do lưu thông buôn bán nếu như không có quy định thú y nào khác (ký hiệu A trong danh sách thuộc mục 102).

Loại 2- Công nhận là hoàn toàn không thích hợp làm thực phẩm cho người

77. Thân thịt và phần phụ phải huỷ bỏ hoặc phải xử lý khác vì không ăn được trong các trường hợp sau đây (ký hiệu T trong danh sách thuộc mục 102):
- a. Độc hại cho người chế biến thịt, người tiêu thụ và/ hoặc gia súc;
 - b. Chứa các chất tồn dư quá giới hạn quy định;
 - c. Về cảm quan thấy có sự khác nhau không chấp nhận được so với thịt bình thường;
 - d. Thịt thuộc loại thích hợp có điều kiện làm thực phẩm cho người nhưng biện pháp xử lý theo qui định không có hoặc không được thực hiện.

78. Việc loại bỏ hoặc sử dụng thịt không thích hợp làm thực phẩm cho người phải đảm bảo tránh gây ô nhiễm, gây nguy hại sức khỏe cho người hoặc động vật hoặc chuyển sang sử dụng làm thực phẩm cho người một cách bất hợp pháp.
79. Ở nơi có thể thực hiện được, thịt không thích hợp làm thực phẩm cho người có thể được phép dùng làm thức ăn cho động vật với điều kiện có các biện pháp thích hợp phòng tránh việc dùng sai mục đích và gây nguy hiểm cho sức khỏe người và động vật.
80. Nói chung, các tiêu chí sau đây phải được áp dụng:
 - (a) Dùng làm thức ăn cho động vật:
Nếu không gây ra nguy hại cho sức khỏe và đảm bảo không bị sử dụng sai mục đích;
 - (b) Dùng làm thức ăn vô khuẩn cho động vật cảnh;
Nếu không gây ra nguy hại cho sức khỏe người và động vật và đảm bảo không bị sử dụng sai mục đích làm thực phẩm cho người;
 - c) Chiết rút chất béo ở nhiệt độ cao bằng con đường khô hoặc ẩm:
Nếu quá trình xử lý đảm bảo chắc chắn diệt hết vi khuẩn gây bệnh, sản phẩm sau xử lý không còn chất tồn dư có hại cho sức khỏe người hoặc động vật, và sau khi xử lý đảm bảo thịt không bị nhiễm lại;
 - d) Sử dụng cho công nghiệp không phải là công nghiệp thực phẩm, sau khi đã xử lý nhiệt với điều kiện không gây hại cho sức khỏe người hoặc động vật;
 - e) Đốt thành than hoặc chôn sâu hoặc tiêu huỷ bằng phương tiện an toàn khác;

Loại 3- Công nhận là một phần phải huỷ bỏ hoặc xử lý khác khi không thích hợp làm thực phẩm cho người

81. Phần có bệnh tích khu trú trên thân thịt hoặc trên phần phụ, phần có bệnh tích phải cắt riêng ra, và phần lành được dùng làm thực phẩm cho người (phân loại thành hoàn toàn thích hợp và không hạn chế, hoặc có điều kiện, hoặc tất cả các loại thích hợp khác). Trong bảng danh mục kết luận ký hiệu D được dùng để chỉ phần thịt phải cắt riêng ra và huỷ bỏ hoặc quy định khác. Phần thịt cắt riêng áp dụng cùng một phương pháp như đối với thịt thuộc loại 2 (hoàn toàn không thích hợp để làm thực phẩm cho người).

Loại 4- Công nhận là thích hợp có điều kiện làm thực phẩm cho người

82. Thân thịt bị tạp nhiễm, hoặc có hại cho sức khỏe người hoặc động vật nhưng có thể xử lý có giám sát sao cho thịt trở thành an toàn và hoàn hảo, có thể quyết định phân vào thuộc loại thích hợp có điều kiện làm thực phẩm cho người (ký hiệu K theo danh sách trong mục 102). Nếu cần thiết, các cơ quan phủ tạng phải được xử lý tương tự như thân thịt hoặc loại bỏ một phần hoặc hoàn toàn không làm thực phẩm cho người.
83. Có nhiều tiêu chí khác nhau được sử dụng tùy theo tình hình kinh tế và khả năng kỹ thuật
84. Thịt phải được bảo quản dưới sự giám sát của kiểm tra viên thú y cho đến khi được xử lý xong.
85. Các loại bệnh và khuyết tật khác nhau đòi hỏi phương pháp xử lý khác nhau. Các thủ tục sử dụng để loại bỏ các chất có hại ra khỏi thịt đã ghi ở danh mục sau. Trong danh mục các loại bệnh và khuyết tật thuộc mục 101, có trình bày phương pháp hoặc các phương pháp xử lý tương ứng cho mỗi trường hợp cụ thể.

“Kh”- trước khi đưa thịt vào lưu thông, thịt phải được xử lý bằng luộc chín hoặc xử lý bằng hơi nước; thời gian xử lý phải được quy định tùy theo kích thước và hình dạng miếng thịt, sao cho phần trong cùng của mỗi miếng thịt phải đạt nhiệt độ 90°C. Điều này có thể đạt được khi đun sôi trong 150 phút, miếng thịt không lớn hơn 10 cm³. Mặt khác, luật lệ phải cho phép bất kỳ cách xử lý hoặc quy trình kỹ thuật nào đảm bảo diệt hết mầm bệnh có liên quan.

“Kf” trước khi đưa thịt vào lưu thông, thịt phải được xử lý hoặc bằng nhiệt độ cao hoặc đông lạnh, sao cho giết hết ký sinh trùng có liên quan. Thời gian và nhiệt độ xử lý tùy thuộc vào bản chất và kích thước của miếng thịt phải xử lý theo loại ký sinh trùng có liên quan.

86. Các phương pháp có hiệu quả tương tự như phương pháp đã diễn tả trong mục 85 có thể được cơ quan kiểm tra có thẩm quyền cho phép áp dụng.
87. Sau khi được xử lý, thịt phải được đánh dấu theo yêu cầu của cơ quan kiểm tra có thẩm quyền.
88. Thịt phải được huỷ bỏ hoặc quy định không được làm thực phẩm cho người nếu yêu cầu xử lý không được thực hiện theo đúng hướng dẫn.

Loại 5 - Công nhận là thịt có một số nhược điểm nhỏ nhưng thích hợp làm thực phẩm cho người.

89. Là loại thịt có một hoặc một vài khuyết tật do kiểm tra viên thú y phát hiện nhưng khi phân tích không thấy có chất độc hại cho sức khoẻ con người, loại thịt này có thể coi là thích hợp làm thực phẩm cho người (ký hiệu I trong danh mục thuộc mục 102) với điều kiện thịt được đánh dấu sao cho người tiêu dùng có thể nhận ra đó là thịt có phẩm chất thấp. Phương pháp này phải được cơ quan kiểm tra có thẩm quyền quy định sao cho người tiêu thụ không bị nhầm lẫn. Nếu cơ quan kiểm tra có thẩm quyền không chấp nhận và không quy định loại thịt này thì thịt coi như sẽ được phân vào loại 2, đó là không thích hợp làm thực phẩm cho người.

Loại 6 - Công nhận là thích hợp làm thực phẩm cho người nhưng hạn chế khu vực sử dụng.

90. Nếu luật thú y quy định như trên, thịt động vật đến từ một vùng đang cách ly do có dịch và các quy định còn lại đều đáp ứng các yêu cầu đánh giá là thịt thích hợp làm thực phẩm cho người (loại 1) thì được phép dùng làm thực phẩm cho người trong khu vực hạn chế với điều kiện không gây hại cho sức khoẻ con người. Loại thịt như vậy không được phép phân phối ngoài khu vực quy định (ký hiệu L trong danh mục ở 102).
91. Nếu luật thú y quy định, thịt của con vật đến từ vùng hạn chế đã tiêm chủng và do vậy chúng là vật mang bệnh, sẽ không được lưu thông ngoài khu vực hạn chế quy định.
92. Thịt thích hợp làm thực phẩm cho người nhưng hạn chế khu vực giới hạn sử dụng phải được đánh dấu rõ ràng. Chỉ được phép buôn bán và phân phối loại thịt này thông qua các chủ hàng có giấy phép đặc biệt và được giám sát buôn bán chặt chẽ hoặc nếu điều kiện kinh tế cho phép hạn chế sử dụng trong các cơ quan được quản lý tốt.
93. Thịt giữ lại chờ kết quả xét nghiệm trong phòng thí nghiệm.

a) Nếu cần xét nghiệm vi trùng hoặc thử sinh học do khi kiểm tra trước hoặc sau khi giết mổ thấy có lý do để phân loại là thịt phải huỷ bỏ trừ phi kết quả xét nghiệm trong phòng thí nghiệm có thể khẳng định không có mầm bệnh hoặc dấu hiệu nhiễm trùng.

b) Nếu trong quá trình kiểm tra, việc ghi chép từ khu vực chăn nuôi hoặc từ các nguồn tin chính thức khác có nghi ngờ cho thấy cần phải xét nghiệm hoá chất, độc tố, tổ chức học xét nghiệm trong phòng thí nghiệm; và

c) Nếu xét nghiệm giun bao (*Trichinella spiralis*) hoặc các loại khác cần phải thực hiện nhưng ngay lúc kiểm tra sau khi giết mổ không có phương tiện để tiến hành.

Chú thích - Vai trò của phòng thí nghiệm trong việc kiểm tra sau khi giết mổ trong khuôn khổ của tiêu chuẩn này tuân theo các nguyên lý sau đây:

- a. Sự đánh giá phải xuất phát từ kết quả kiểm tra lâm sàng và hình thái trước và sau khi giết mổ được coi là đủ, và xét nghiệm trong phòng thí nghiệm không cần thiết cho các trường hợp kết quả lâm sàng và hình thái không thể nhầm lẫn. Trong trường hợp nghi ngờ, thịt phải được huỷ bỏ trừ phi kết quả xét nghiệm trong phòng thí nghiệm chỉ ra rằng có thể có quyết định khác nhưng kém hà khắc hơn và đánh giá đó không làm ảnh hưởng tới sức khoẻ con người và động vật.

- b. Xét nghiệm trong phòng thí nghiệm trong nhiều trường hợp loại bỏ được nghi ngờ trong khi kiểm và giữ lại được nhiều thực phẩm có giá trị mà nếu không làm như vậy thì đã bị huỷ bỏ. Xuất phát từ quan điểm kinh tế và dinh dưỡng, xét nghiệm trong phòng thí nghiệm như vậy thực chất rất cần thiết.
- c. Người ta nhận thấy rằng do pháp luật hoặc do tập quán một số hệ thống quốc gia về kiểm tra giết mổ có thể có một vai trò khác hoặc chức năng rộng hơn cho việc kiểm tra trong phòng thí nghiệm. Người ta cũng thấy rằng sự tiến bộ nhanh chóng của các kỹ thuật xét nghiệm hàng ngày trong phòng thí nghiệm làm cho hướng xét nghiệm này được áp dụng rộng hơn. Điều này không có gì trái với quy định của tiêu chuẩn này, miễn là các thủ tục đó có hiệu quả ngang với các thủ tục trình bày ở đây và các đánh giá đưa ra liên quan đến bệnh và khuyết tật không kém chặt chẽ hơn các đánh giá được khuyến cáo trong tiêu chuẩn này.

94. Thịt được giữ lại phải được kiểm tra viên giết mổ, giám sát cho đến khi đưa ra đánh giá cuối cùng.

CHƯƠNG 9 : ĐÁNH GIÁ CUỐI CÙNG ĐƯỢC KHUYẾN CÁO

- 95. Cần chú ý rằng các đánh giá trong bảng phụ lục sau phải được coi là hướng dẫn và không có tính chất thay thế cho các đánh giá xuất phát từ nghiệp vụ chuyên môn.
- 96. Mục đích của các bảng danh mục về đánh giá chỉ để phân ra các loại đánh giá thích hợp, khi cần làm một chẩn đoán, dựa vào các kiến thức hiện nay và các nguyên lý mà tiêu chuẩn này đã trình bày.
- 97. Trong các bảng danh mục về đánh giá, bệnh và khuyết tật được liệt kê ra thành 3 mục chính: Các nhận xét chung, danh mục bệnh khu vực và danh mục các nguyên nhân gây bệnh căn như trình bày trong mục 101, được mã hoá theo "số nhóm các loại bệnh và khuyết tật". Đánh giá chính thức tương ứng được đánh dấu bằng ký hiệu đánh giá theo chữ A, TD, K, I và L như đã được giải thích trong mục từ 73 đến 92 và được tóm tắt theo danh mục trong mục 102. Đồng thời cũng kèm theo các điểm có liên quan chú ý đặc biệt, hoặc các tiêu chí để chọn lựa để đánh giá thích hợp.
- 98. Đánh giá dựa trên các nhận xét chung thường lần át các nhận xét mang tính khu vực và/ hoặc bệnh căn đặc trưng, trừ phi phần nhận xét chung được xem xét thật khắt khe.
- 99. Việc xét nghiệm trong phòng thí nghiệm nhằm có số liệu để đưa ra đánh giá chính thức phải tiến hành nếu số liệu thêm đó góp phần quyết định chính thức. Xét nghiệm trong phòng thí nghiệm phải tuân theo các nguyên tắc trình bày trong mục 93 và phải được cơ quan kiểm tra có thẩm quyền quy định.
- 100. Thịt của động vật không được kiểm tra trước và/ hoặc sau khi giết mổ phải được coi là bị loại bỏ trừ trường hợp xét nghiệm trong phòng thí nghiệm cho thấy không có nguy cơ có hại nào cho sức khoẻ người và/ hoặc động vật.
- 101. Mã nhóm bệnh và khuyết tật
 - 1. Tài liệu phát hiện chung
 - 2. Danh mục bệnh tích theo khu vực
 - 2.1. Nhiễm trùng rốn
 - 2.2. Bệnh hệ thần kinh
 - 2.3. Bệnh tích tim, bao tim và mạch
 - 2.4. Bệnh hệ hô hấp
 - 2.5. Bệnh màng phổi

- 2.6. Bệnh dạ dày và ruột
- 2.7. Bệnh màng bụng
- 2.8. Bệnh gan
- 2.9. Bệnh đường tiết niệu
- 2.10. Bệnh của cơ quan sinh dục cái và các bệnh liên quan đến cơ quan này
- 2.11. Bệnh của cơ quan sinh dục đực
- 2.12. Bệnh bầu vú
- 2.13. Bệnh xương, khớp và màng bao gân
- 2.14. Bệnh cơ
- 2.15. Bệnh da
- 3. Danh mục dựa theo bệnh căn
 - 3.1. Tình trạng do ký sinh trùng
 - 3.2. Bệnh do đơn bào (protozoa)
 - 3.3. Tình trạng do vi khuẩn (gồm cả vi khuẩn có liên quan)
 - 3.4. Tình trạng do virus
 - 3.5. Hội chứng có nguyên nhân không rõ hoặc không truyền nhiễm
 - 3.6. Độc tố nấm và nhiễm nấm độc
- 102. Ký hiệu các loại đánh giá chính thức dùng trong bảng:
 - A- Thích hợp làm thực phẩm cho người
 - T- Hoàn toàn không thích hợp làm thực phẩm cho người
 - D- Để chỉ các cơ quan hay phần thân thịt không thích hợp dùng làm thực phẩm cho người.
 - K- Thích hợp có điều kiện làm thực phẩm cho người
(Kh- xử lý bằng nhiệt độ cao; Kf- xử lý bằng nhiệt độ cao hoặc đông lạnh)
 - I- Thịt có một số nhược điểm nhỏ nhưng thích hợp làm thực phẩm cho người.
 - L- Chấp thuận làm thực phẩm cho người nhưng phân phối hạn chế theo khu vực được giới hạn
 - ... Không thích hợp (ví dụ Trường hợp huỷ bỏ hoàn toàn, các cột trong bảng có liên quan đến huỷ bỏ một phần không được áp dụng).

CHƯƠNG 10 : VIỆC SẮP ĐẶT VÀ DẤU ĐÓNG

Sau khi kiểm tra viên giết mổ có quyết định chính thức là thích hợp , thích hợp có điều kiện, hoặc không thích hợp làm thực phẩm cho người, thịt cần phải được đánh dấu một cách có hệ thống để thể hiện rõ các kết quả kiểm tra trên. Điều này nhằm tạo điều kiện cho việc kiểm tra theo dõi và sử dụng/ loại bỏ thịt trước khi đến với người tiêu dùng cũng như đảm bảo an toàn và tính hoàn hảo của thịt một cách chính thức cho người tiêu dùng.

- 103. Kích thước, hình dáng và từ ngữ của dấu cũng như màu và thành phần hoá học của mực dấu dùng để đánh dấu thịt phải được cơ quan kiểm tra có thẩm quyền quy định và dùng thống nhất trong cả nước. Cần xem xét kỹ ngay từ khâu thiết kế để dấu dễ nhận biết ngay, trong bất kỳ điều kiện làm việc nào. Chỉ các dấu có dùng lửa hoặc dùng mực thích hợp mới được áp lên thịt.

104. Thịt, đầu, các cơ quan phủ tạng, sau khi kiểm tra trước và sau khi giết mổ được đánh giá là thích hợp làm thực phẩm cho người mà không kèm theo hạn chế nào phải có dấu rõ ràng và đúng quy định.
105. Thịt (kể cả đầu, cơ quan, phủ tạng) phải yêu cầu xử lý bằng nhiệt độ hoặc đông lạnh để chuyển sang loại thích hợp làm thực phẩm cho người phải được nhận biết hoặc nếu cần thiết có dấu nói lên tính chất này và khi lưu giữ phải có sự giám sát của kiểm tra viên giết mổ cho đến khi xử lý xong và thân thịt và các phần được đánh giá là thích hợp làm thực phẩm cho người.
106. Tất cả thân thịt, phần thân thịt, cơ quan và phủ tạng mà kết quả khi kiểm tra trước và sau khi giết mổ đánh giá không thích hợp làm thực phẩm cho người, và bào thai động vật phải được lưu giữ chắc chắn theo yêu cầu kiểm tra viên cho đến khi có dấu, nhuộm màu xong, xử lý xong, làm biến chất hoàn toàn hoặc tiêu huỷ hoàn toàn sao cho chúng không thể bị đưa trở lại làm thực phẩm cho người.
107. Nhãn và dấu dùng để dấu đóng áp lên thịt khi kiểm tra phải được giữ sạch sẽ trong khi còn sử dụng. Chúng được kiểm tra viên giết mổ giữ và được sử dụng dưới sự giám sát của kiểm tra viên.

CHƯƠNG 11: SỬ DỤNG CÁC TÀI LIỆU PHÁT HIỆN ĐƯỢC KHI KIỂM TRA THỊT

Cơ quan kiểm tra có thẩm quyền phải cung cấp các kết quả phát hiện được khi kiểm tra giết mổ cho các cơ quan khác có trách nhiệm về sức khỏe người và động vật. Để đạt mục đích này, cơ quan kiểm tra có thẩm quyền phải đảm bảo rằng các hoạt động giám sát phải được tách ra khỏi những hoạt động kiểm tra thông thường đối với thịt và không cản trở các công tác kiểm tra thịt hoàn thành có hiệu quả hoặc hoạt động có liên quan của công nghiệp thịt. Nơi có thể được, cơ quan kiểm tra có thẩm quyền phải đóng vai trò tích cực trong các chương trình phòng chống bệnh động vật nhằm cung cấp thịt an toàn và hoàn hảo và các thông tin cho các cơ quan thích hợp về bệnh chung cho động vật và người.

108. Cơ quan kiểm tra có thẩm quyền phải hợp tác chặt chẽ với các cơ quan có trách nhiệm về y tế và thú y sao cho kết quả kiểm tra giết mổ được sử dụng tối đa.
109. Các hoạt động nghiên cứu và giám sát phải được tách khỏi công việc kiểm tra giết mổ hàng ngày và các công việc xét nghiệm trong phòng thí nghiệm có thể phục vụ ngay cho việc xác lập quyết định, và không được làm chậm lại quá trình đánh giá kiểm tra sau khi giết mổ.
110. Trong khi kiểm tra trước hoặc sau khi giết mổ khi phát hiện có bệnh thuộc danh mục công bố phải thông báo ngay cho cơ quan thú y để kiểm soát và chống các bệnh đó.
111. Trong khuôn khổ những cuộc điều tra gắn với các dự án đặc biệt chống và thanh toán bệnh, cần phải khai thác tối đa các tài liệu phát hiện được khi kiểm tra trước và sau khi giết mổ kể cả việc thu hồi và ghi chép những thông tin để nhận dạng những con vật có bệnh (khuyên tai mang số hiệu, số xăm, nhãn hiệu...). Nếu có yêu cầu của chương trình, các test chẩn đoán đặc hiệu phải được tiến hành trong lò mổ miễn là không gây cản trở cho quá trình kiểm tra khi giết mổ và hoạt động quản lý của lò mổ.
112. Cơ quan kiểm tra có thẩm quyền phải định kỳ tổng kết và đánh giá thống kê liên quan tới các tài liệu phát hiện được khi kiểm tra giết mổ và các quyết định đánh giá đã ban ra. Các kết quả thống kê được phải được cung cấp cho cơ quan thú y để theo dõi các biến động về tình hình sức khỏe gia súc qua phản hồi lại các tài liệu phát hiện được khi kiểm tra thịt.
113. Nơi áp dụng được thì kiểm tra viên thú y ở lò mổ phải tích cực tham gia công tác phòng chống dịch bệnh không những chỉ là người cung cấp thông tin mà còn phải gắn vào các công việc phòng chống dịch bệnh cho gia súc.

Bảng A- Hướng dẫn yêu cầu kiểm tra sau khi giết mổ- Đầu

Đây là hướng dẫn yêu cầu kiểm tra- Xem trình tự chương 6. Việc kiểm tra có thể tiến hành kỹ lưỡng hay không tùy theo kết quả phân tích rủi ro.

	Bò (kể cả bê)	Ngựa	Dê và cừu	Lợn
Chung	Khám bên ngoài. Khám khoang mũi và miệng bò, ngựa và lợn			
Hạch lâm ba				
Hầu	Rạch (a)	Rạch	-	Rạch
Mang tai	Rạch (a)	Rạch	-	-
Sau hầu	Rạch (a)	Rạch	-	-
Lưỡi	Sờ nắn (a)	Sờ nắn	-	-
Yêu cầu khác	Kiểm tra bệnh C.bovis theo mục 58 (e) của tiêu chuẩn này	Kiểm tra bệnh loét mũi theo mục 58 (g) của tiêu chuẩn này	-	Kiểm tra bệnh gao lợn theo như mục 58 (i,k) của tiêu chuẩn này

Chú thích

- "Rạch" trong bảng trên có nghĩa kiểm tra bằng mắt và rạch nhiều nhất hoặc cắt lát
- Sờ nắn có nghĩa nhìn và nắn
- Hạch hầu có nghĩa là hạch lymphonodi mandibulares
- Mang tai có nghĩa là hạch lymphonodi parotidei
- Hạch hầu là hạch lymphonodi retropharyngei
- (a) có nghĩa là chỉ kiểm tra ở bê dưới 6 tuần tuổi

Bảng B - Hướng dẫn yêu cầu kiểm tra sau khi giết mổ- Phũ tạng

Đây là hướng dẫn yêu cầu kiểm tra - Xem trình tự chương 6. Việc kiểm tra có thể tiến hành kỹ lưỡng hay không tùy theo kết quả phân tích rủi ro.

	Bò (kể cả bê)	Ngựa	Dê và cừu	Lợn
Hạch lâm ba				
Màng treo	Quan sát	Quan sát	Quan sát	Sờ nắn (b)
Hạch gan	Rạch (a)	Sờ nắn	Sờ nắn	Sờ nắn
Phổi	Rạch (a)	Rạch (a)	Sờ nắn	Rạch
Dạ dày ruột	Quan sát (a)	Quan sát	Quan sát	Quan sát
Lách	Sờ nắn	Sờ nắn	Quan sát	Quan sát
Gan	Sờ nắn. Quan sát túi mật (trừ ngựa). Bò trên 6 tuần tuổi, rạch tìm sán lá gan.			
Phổi	Sờ nắn trừ dê và cừu, mở phế quản bằng cách cắt ngang phổi chỗ thùy hoành. Ngựa phải mở xem thanh quản, phế quản và khí quản			
Tim	Quan sát tim sau khi bỏ màng tim. Các yêu cầu kiểm tra khác ở bò trên 6 tuần tuổi, xem mục 58 (f) và ở lợn xem mục 58(k).			
Thận	Quan sát sau khi khoét bề thận. Ngựa trắng và xám: rạch toàn thận.			
Tử cung	Sờ nắn	Quan sát	Quan sát	Quan sát

Chú thích:

- "Rạch" trong bảng trên có nghĩa kiểm tra bằng mắt và rạch nhiều nhất hoặc cắt lát.
- Sờ nắn có nghĩa nhìn và nắn
- Màng treo có nghĩa là hạch lymphonodi mesenterici.

- Hạch gan là các hạch lymphonodi hepatici (portales)
- Hạch phổi là các hạch lymphonodi tracheobronchiales et mediastinales
- (a) có nghĩa là chỉ kiểm tra ở bê dưới 6 tuần tuổi
- (b) có nghĩa là chỉ rạch nếu quan sát thấy bệnh tích ở hạch dưới lưỡi

Bảng C- Hướng dẫn yêu cầu kiểm tra sau khi giết mổ- Thân thịt

Đây là hướng dẫn yêu cầu kiểm tra - Xem trình tự chương 6. Việc kiểm tra có thể tiến hành kỹ lưỡng hay không tùy theo kết quả phân tích rủi ro

	Bò (kể cả bê)	Ngựa	Dê và cừu	Lợn
Chung	Kiểm tra thân thịt (kể cả cơ, xương hở, khớp, bao gân...) để xác định bệnh hoặc khuyết tật. Chú ý phần thân, mức độ phồng tiết, màu, các màng tương mạc (màng phổi, màng bụng), việc làm sạch và các mùi bất thường khác			
Hạch lâm ba				
Hạch bẹn	Sờ nắn (a)	Sờ nắn	Sờ nắn	Sờ nắn
Hạch mông trong và ngoài	Sờ nắn	Sờ nắn	Sờ nắn	Sờ nắn (b)
Hạch vai	Sờ nắn	Sờ nắn	Sờ nắn	-
Hạch khoeo chân	-	-	Sờ nắn	-
Hạch thận	Sờ nắn	Sờ nắn	-	Sờ nắn
Yêu cầu khác		Ngựa trắng và xám kiểm tra theo mục 58 (h) của tiêu chuẩn này		Sờ nắn vị trí thích.

Chú thích:

- "Hạch bẹn" (còn gọi là hạch trên vú) là hạch lymphonodi inguinales superficiales
- Hạch mông trong và ngoài là hạch lymphonodi iliaci
- Hạch vai là hạch lymphonodi cervicales profundi caudales
- Hạch thận là hạch lymphonodi renales
- Hạch khoeo chân là hạch lymphonodi popliteae
- (a) có nghĩa là thường xuyên rạch đối với bò đã hoặc đang cho sữa
- (b) Có nghĩa là hạch xương chậu ở lợn

PHỤ LỤC
ĐÁNH GIÁ CUỐI CÙNG ĐƯỢC KHUYẾN CÁO

Các điều kiện hoặc không bình thường của bệnh và bệnh học	Đánh giá cuối cùng được khuyến cáo					Chú thích
	Thân thịt	Phủ tạng	Bệnh hay làm ảnh hưởng đến		Những cái khác	
			Phần thân thịt	Cơ quan		
1	2	3	4	5	6	7
1. Tài liệu phát hiện						
1.1 Sốt, yếu, triệu chứng chung cho thấy có bệnh truyền nhiễm cấp	T	T	...	...	...	Có thể kết luận kh/D/.../... khi phát hiện ngay sau khi giết mổ, có kết quả xét nghiệm trong phòng thí nghiệm cho thấy có tác nhân không gây bệnh cho người, và không có dấu hiệu nhiễm trùng máu, thuốc hoặc hoá chất kháng khuẩn, khi phát hiện ở lúc trước, trong và sau giết mổ với dễ phòng đặc biệt, nếu điều kiện cho phép, đưa ra khỏi lò mổ cho đến khi khỏi bệnh với điều kiện không làm lây lan bệnh hoặc không gây hại cho người, con vật không phải chịu đau đớn và có thể khỏi bệnh khi chữa chạy; huỷ nếu bệnh chẩn đoán trước khi giết mổ thấy cần huỷ bỏ hoàn toàn.
1.2. Kích động nhiệt độ tăng, kiệt sức do stress, không có triệu chứng bệnh cấp tính	...	...	...	...	...	Hoãn giết mổ và kiểm tra lại trước khi giết mổ vào thời gian thích hợp sau khi cho động vật nghỉ ngơi. Nếu không có điều kiện cho nghỉ xem 1.10
1.3. Có triệu chứng của trạng thái hôn mê như nhiệt độ thấp, mạch chậm, cảm giác rối loạn	T	T	...	...	...	Tiêu huỷ nơi và cách thích hợp; nếu không phải chịu đau đớn và có khả năng khỏi có thể cho hoãn giết mổ và sau đó kiểm tra lại. Nếu triệu chứng giảm khi kiểm tra lại, I hoặc Kh nếu tháo tiết tốt và kết quả xét nghiệm trong phòng thí nghiệm không thấy nguy cơ.

1	2	3	4	5	6	7
1.4. Triệu chứng bệnh mãn tính chung chung như thiếu máu, còi cọc, gày còm, ốm yếu, các cơ quan thoái hoá, phù thũng	T	T	...	...	...	Tuỳ thuộc vào tình trạng bệnh lý, L, I hoặc Kh, nếu điều kiện kinh tế cho phép; Chỉ T nếu bệnh mãn tính; xét nghiệm labo nếu nghi bệnh truyền nhiễm, mới sử dụng chất kháng khuẩn hoặc nghi ngờ tồn dư thuốc.
1.5. Triệu chứng nhiễm đơn bào máu cấp như huyết tố niệu, thiếu máu hoặc yếu	T	T	...	...	...	Hoặc Kh/D/.../..., với điều kiện động vật trông không quá trầm trọng, xét nghiệm không thấy chất kháng khuẩn tồn dư, và/ hoặc nhiễm trùng.
1.6. Nhiễm độc huyết, mủ huyết, hoặc độc huyết	T	T	...	...	...	
1.7. Mùi, màu khác lạ, vv...						
1.7.1. Do bệnh cấp hay mãn	T	T	...	...	...	
1.7.2. Do thức ăn (như bột cá vv...)	I	I	I	I	...	Trong trường hợp nghiêm trọng T/T/.../...
1.7.3. Do thuốc						
a). Phổ biến	T	T	...	...	...	
b). Cục bộ	A	A	D	D	...	Nếu đã hết thời gian quy định về dùng thuốc và xét nghiệm thấy chỉ có tính địa phương; ngược lại T/T/.../...
1.7.4. Mùi của giới	I	I	...	...	...	Hoặc A/A/.../...nếu không còn sau khi nấu thử, L hoặc I, tùy theo khẩu vị người tiêu dùng địa phương. Hoặc Kh nếu dùng làm thực phẩm nấu, chặt nhỏ làm thức ăn người không bốc mùi khi ăn. Kết luận khác tùy theo yêu cầu khẩu vị địa phương; mùi nhẹ tồn tại dai dẳng I/I/.../...mùi nặng T/T/.../...
1.8. Đang chữa, mới đẻ, mới sảy thai	...	...	...	...	...	Đưa ra khỏi lò mổ nếu không gây hại cho sức khỏe người hoặc gia súc. Ngược lại A, I, Kh hoặc T tùy thuộc vào trạng thái động vật và kết quả xét nghiệm, nếu cần thiết. Bình thường không đưa đi giết mổ động vật trong 10 ngày sau khi

1	2	3	4	5	6	7
						dễ hoặc xảy thai.
1.9. Thai và sơ sinh không phát triển	T	T	...	...	...	L nếu tập quán địa phương cho phép
1.10. Giết mổ có giám sát đặc biệt hoặc khẩn cấp						
1.10.1. Lấy tiết không hợp cách, mất màu, phù nề vv...	T	T	...	...	...	
1.10.2. Mất ý thức đột ngột không có triệu chứng trước hoặc khám sau giết mổ không thấy bệnh tích (ví dụ đau tim)	T	T	...	...	...	Hoặc Kh/ Kh/.../... tùy thuộc vào lấy máu và kết quả trong phòng xét nghiệm
1.10.3. Xác chảy máu sau chết tự nhiên hoặc động vật kiệt sức	T	T	...	...	...	
1.10.4. Chết ngạt	T	T	...	...	...	
1.10.5. Giết khẩn cấp do tai nạn trong khi vận chuyển hoặc ở gần lò mổ	I	I	...	...	...	Hoặc nếu lấy máu tốt và điều kiện vệ sinh tốt A/A/.../.../ nhưng không xuất khẩu; T/T/.../.../ nếu lấy máu không hết hoặc nghi chảy máu sau khi chết tự nhiên
1.10.6. Động vật giết mổ chưa kiểm tra trước giết mổ						
a). Có bằng chứng giết mổ khẩn cấp do vết thương (ví dụ tai nạn).	A	A	D	D	...	Với điều kiện lấy hết máu và phụ thuộc kết quả xét nghiệm nhưng không được xuất khẩu; T/T/.../.../ nếu không tháo hết máu
b). Không đủ bằng chứng giết mổ khẩn cấp do vết thương	T	T	...	...	...	
1.11. Động vật giết mổ theo chương trình thanh toán bệnh hay chiến dịch vệ sinh nhưng phản ứng âm tính và không có triệu chứng bệnh khi kiểm tra trước và sau giết mổ	L	L	...	...	...	Hoặc Kh/Kh/.../.../ (đối với động vật ốm có dương tính, xem đề mục liên quan đến bệnh)
1.12. Thân thịt giữ lại để xét nghiệm vì không có cơ sau khi chết	I	D	...	...	...	Trừ khi đã phân loại T hoặc Kh do phát hiện khi kiểm tra các vấn đề khác

1	2	3	4	5	6	7
1.13. Động vật giết mổ tại khu vực riêng biệt để chuẩn đoán hoặc để ngăn chặn dịch bệnh (ví dụ trường hợp bệnh thuộc danh mục công bố dịch)	T	T	...	...	...	
2. Danh mục bệnh tích theo khu vực						
2.1. Nhiễm trùng rốn lây lan toàn cơ thể	T	T	...	...	...	
2.2. Bệnh hệ thần kinh						
2.2.1. Viêm não và màng não cấp	T	T	...	...	...	Hoặc A/A/.../... Não D nếu xét nghiệm thấy không phải do nhiễm trùng (như cảm nắng)
2.2.2. Viêm não mạn, viêm màng não và gian não với thân nhiệt bình thường không có triệu chứng khác	A	A	D	...	Não D	Trừ khi đã phân loại T theo 1.4 của bảng này
2.2.3. Áp xe não						
a) Do mủ huyết	T	T	...	...	...	
b) Tổn thương cục bộ không kèm theo bệnh tích khác	A	A	...	...	Não D	Phụ thuộc kết quả xét nghiệm
2.2.4. Tập tính khác lạ (cảm giác rối loạn)						
a) Lấy máu tốt và không có triệu chứng hoặc bằng chứng khác nghi có bệnh	A	A	...	...	...	Xem lại số liệu ghi chép của trại gốc, và kết quả xét nghiệm để ngăn chặn độc tố hay các điều kiện lây nhiễm theo phân loại T hoặc K.
b) Có triệu chứng bệnh nhiễm trùng hoặc nhiễm độc	T	T	...	...	...	
2.3. Bệnh tích tim, bao tim và mạch						
2.3.1. Viêm màng tim ngoài						
a) Viêm bao tim xuất dịch cấp nhiễm độc huyết và viêm do chấn thương có sốt, xuất tiết dịch lượng lớn trong bao tim, rối loạn tuần hoàn, thoái hoá các cơ quan hoặc mùi	T	T	...	...	...	

1	2	3	4	5	6	7
là						
b) Viêm bao tim tiết dịch á cấp tính	Kh	Kh	D	D	...	Nếu xét nghiệm thấy không nhiễm trùng toàn thân hoặc có chất kháng khuẩn lưu tồn.
c) Viêm bao tim mạn, không có rối loạn khác ở động vật nuôi dưỡng tốt	A	A	D	D	...	
d) Viêm bao tim mạn tính do chấn thương	A	A	D	D	...	Phụ thuộc kết quả xét nghiệm
2.3.2 Viêm màng trong tim						
a) Viêm loét và viêm sùi tại chỗ không biến chứng	Kh	Kh	...	D	...	Hoặc L thay vì Kh nếu Kh không kinh tế, phải có kết quả xét nghiệm vi trùng âm tính (xem 3.3.13)
b) Đã lên sẹo toàn bộ	A	A	...	D	...	
c) Viêm sùi tim có bệnh tích phổi hoặc gan, mới thẩm nhập, yếu ớt, vv...	T	T	...	...	...	
2.3.3. Bệnh tích không do nhiễm khuẩn (dị tật, vv...)	A	A	...	D	...	Trừ phi đã phân loại T theo 1.4 của bảng này
2.3.4. Phình mạch do giun sán ở ngựa						
a) Phù thũng, nhồi huyết hoặc xuất huyết chân sau	A	A	D	D	...	
b) Viêm màng bụng, rối loạn tuần hoàn màng treo, hoặc ruột hoặc yếu ớt.	T	T	...	...	...	
2.4. Bệnh hệ hô hấp						
2.4.1. Viêm xoang	A	A	A	...	Đầu D	Nếu không áp dụng được 1.1 hoặc 1.4
2.4.2. Các loại viêm phổi cấp như viêm cuống phổi - phổi lan rộng, nặng có mủ, bệnh hoại thư phổi viêm phổi hoại thư	T	T	...	...	...	
2.4.3. Viêm phổi cata	A	A	...	D	...	Kết quả xét nghiệm vi trùng phải không thấy bại huyết

1	2	3	4	5	6	7
2.4.4. Viêm phổi và màng phổi lợn						
a) Với biến đổi bệnh lý có sự làm seo rõ rệt	A	A	D	D	...	
b) Trường hợp khác hoặc rối loạn khác	Kh	Kh	D	D	...	Tuỳ theo kết quả xét nghiệm
2.4.5. Viêm phổi á cấp tính (viêm có mủ, viêm phế quản, viêm hen aspiration pneumonia)	Kh	Kh	...	D	...	Tuỳ theo kết quả xét nghiệm và điều kiện là điều 1.1 tương ứng để áp dụng.
2.4.6. Viêm phổi và phế quản ở bê với bệnh tích nhẹ.	A	Kh	D	D	Phổi D	Tuỳ theo kết quả xét nghiệm
2.4.7. Nhiều áp xe trong phổi	T	T	...	...	...	Hoặc Kh/D/.../..., tuỳ theo kết quả xét nghiệm, hoặc A/A/.../D/... Nếu áp xe chưa di hành vào thân thịt hoặc cơ quan khác và động vật trông béo tốt.
2.4.8. Viêm phế quản	A	A	...	D	...	
2.4.9. Viêm phổi do ký sinh trùng	A	A	...	D	...	Nếu điều 1.4 không tương ứng để áp dụng
2.4.10. Khí thũng giãn phổi, có sắc tố, xuất huyết hoặc tràn máu, sắc nước, sắc thức ăn khi giết mổ	A	A	...	D	...	
2.5. Bệnh màng phổi						
2.5.1. Tràn tiết dịch hoặc tràn tương dịch	T	T	...	...	...	Hoặc Kh tuỳ theo kết quả xét nghiệm hoặc tình trạng chung của động vật
2.5.2. Viêm dính và màng fibrin	A	A	D	D	...	Trừ trường hợp lao phải áp dụng điều 3.3.8
2.5.3. Viêm có mủ hoặc viêm hoại thư	T	T	...	...	...	
2.6. Bệnh dạ dày và ruột						
2.6.1. Viêm cata cấp ở động vật trưởng thành						
a) Hạch màng treo tu máu nhưng không có biến đổi khác	A	A	...	D	Ruột D	Hoặc T hoặc Kh tuỳ theo kết quả xét nghiệm
b) Có tu máu ở niêm mạc và hạch màng treo lách to hoặc các	Kh	Kh	...	D	Ruột D	Hoặc T tuỳ theo kết quả xét nghiệm

1	2	3	4	5	6	7
cơ quan thoái hoá.						
2.6.2. Dạ dày và ruột viêm cata mãn tính	A	A	...	D	Ruột D	Hoặc T hoặc Kh tùy theo kết quả xét nghiệm
2.6.3. Viêm ruột nhiễm khuẩn, phủ bọt, có màng hoặc xuất huyết	T	T	...	...	...	Hoặc T tùy theo kết quả xét nghiệm
2.6.4. Táo, tắc ruột (kể cả đau bụng ngựa)						
a) Nghiêm trọng, cấp hoặc có tác dụng toàn thân	T	T	...	...	...	Hoặc Kh tùy theo kết quả xét nghiệm. Đối với ngựa thông thường T
b) Nhẹ không có tác dụng toàn thân	A	A	...	D	...	
2.6.5. Trương to hoặc cứng dạ dày hoặc dạ cỏ						
a) Trường hợp nghiêm trọng	A	A	...	D	...	Hoặc I, Kh hoặc T tùy theo kết quả xét nghiệm và tình trạng động vật
b) Nhẹ	A	A	...	D	...	
2.6.6. Khí thũng ruột lợn	A	A	...	D	...	
2.7. Bệnh màng bụng						
2.7.1. Viêm màng bụng						
a) Cấp, hay lan toả	T	T	...	...	...	
b) Viêm fibrin khu vực	A	A	D	D	...	
2.7.2. Viêm dính có màng fibrin hoặc áp xe có bọc	A	A	D	D	...	Trừ trường hợp lao phải áp dụng điều 3.3.8
2.8. Bệnh gan						
2.8.1. Giãn mao mạch, nang, sỏi mật	A	A	...	D	...	
2.8.2. Nhiễm mỡ	A	A	...	D	...	
2.8.3. Thoái hoá gan, thoái hoá nhu mô, mỡ hay amyloit	A	A	...	D	...	Tùy thuộc kết quả xét nghiệm và tình trạng động vật
2.8.4. Viêm do độc tố, kí sinh trùng hoặc nhiễm khuẩn không đặc hiệu	A	A	...	D	...	Tùy thuộc kết quả xét nghiệm và tình trạng động vật

1	2	3	4	5	6	7
2.8.5. Các nốt ký sinh trùng trong gan	A	A	...	D	...	D cho phần gan bị hại có giới hạn
2.8.6. Gan mới bị hoại thư do vi trùng	Kh	Kh	...	D	...	Hoặc T tùy thuộc kết quả xét nghiệm và trình trạng động vật
2.8.7. Áp xe gan						
a) Áp xe tắc mạch kết hợp với nhiễm trùng rốn, áp xe chấn thương lách	T	T	...	...	...	
b) Áp xe cũ có bọc	A	A	...	D	...	
2.8.8. Hoại thư dạng hạt kê ở bê	T	T	...	...	...	
2.9. Bệnh đường tiết niệu						
2.9.1. Sỏi thận, nang thận, sắc tố	A	A	...	D	...	
2.9.2. Viêm thận (kể cả do ký sinh trùng)						
a) Kèm theo mùi lạ của nước tiểu, u rết huyết hoặc phù thũng	T	T	...	...	...	
b) Mạn tính không có tác dụng toàn thân	A	A	...	D	...	Với điều kiện xét nghiệm ochratoxin (âm tính, xem điều 3.6.2)
2.9.3. Viêm thận trắng (colinephritis)	T	T	...	...	...	Hoặc Kh tùy thuộc vào kết quả xét nghiệm
2.9.4. Viêm thận có mủ và viêm tắc thận	T	T	...	...	...	Hoặc Kh tùy thuộc vào kết quả xét nghiệm
2.9.5. Viêm thận có mủ ở bò						
a) Với thiếu năng thận (u rết huyết)	T	T	...	...	...	
b) Không có rối loạn toàn thân	A	A	...	D	...	
2.9.6 Viêm bể thận						
a) Xuất tiết kèm theo sốt, mùi khai, hoặc viêm thận có mủ	T	T	...	...	...	
b) Không có tác dụng toàn thân	A	A	...	D	...	
2.9.7. Vỡ bàng quang hoặc ống dẫn nước tiểu						

1	2	3	4	5	6	7
a) Trường hợp gây viêm phúc mạc, có mùi nước tiểu, hoặc viêm tế bào thận	T	T	...	...	...	
b) Không có tác dụng toàn thân	A	A	D	D	...	
2.10. Bệnh của cơ quan sinh dục cái và các bệnh liên quan đến cơ quan này						
2.10.1 Viêm tử cung						
a) Viêm cấp tính (bura, màng, hoại tử, nhiễm độc huyết hoặc có thai thối rữa)	T	T	...	...	...	
b) Mạn tính (kể cả có thai gổ, chết lưu) không ảnh hưởng toàn thân	A	A	...	D	...	Tuỳ theo kết quả xét nghiệm
2.10.2. Lưu nhau thai						
a) Không ảnh hưởng toàn thân	A	A	...	D	...	Tuỳ theo kết quả xét nghiệm
b) Kèm theo sốt và ảnh hưởng toàn thân	T	T	...	...	...	
2.10.3. Đẻ khó do viêm tử cung cấp, viêm âm đạo hoại tử hoặc có thai thối rữa	T	T	...	...	...	
2.10.4. Lộn, xoắn, vỡ tử cung kèm theo sốt hoặc viêm màng bụng	T	T	...	...	...	Nếu không thấy triệu chứng khi kiểm tra trước giết mổ hoặc bệnh tích toàn thân sau giết mổ, A hoặc Kh và tuỳ theo kết quả xét nghiệm
2.10.5. Quá nhiều tiết dịch trong tử cung	A	A	...	D	...	Nếu không có triệu chứng bệnh toàn thân và tuỳ theo tình trạng động vật
2.10.6. Huyết tố niệu sau khi đẻ của bò	A	A	D	D	...	
2.11. Bệnh của cơ quan sinh dục đực						
2.11.1. Viêm tinh hoàn và/hoặc viêm tinh hoàn phụ	A	A	...	D	...	Tuỳ theo số liệu ghi chép tại trại chăn nuôi và kết quả xét nghiệm. Sảy thai truyền nhiễm xem điều 3.3.21

1	2	3	4	5	6	7
2.12. Bệnh bầu vú						
2.12.1. Viêm vú						
a) Không ảnh hưởng toàn thân	A	A	...	D	...	
b) Nhiễm khuẩn hoại thư hoặc có ảnh hưởng toàn thân	T	T	...	...	...	
2.12.2. Nhiễm sắc tố tuyến vú lợn	A	A	D	D	...	
2.12.3. Phù thũng bầu vú	A	A	...	D	...	
2.13. Bệnh xương, khớp và màng bao gân						
2.13.1. Gãy	Bệnh tích của vết gãy đã hoàn toàn lành có thể tách bỏ theo phương pháp do cơ quan kiểm tra có thẩm quyền quy định					
a) Không có rối loạn (mới hay đang phục hồi)	A	A	D	...	...	
b) Nhiễm trùng hoặc có biểu hiện tác dụng toàn thân	T	T	...	...	...	
2.13.2. Viêm màng xương						
a) Cục bộ	A	A	D	...	...	Tuỳ theo kết quả xét nghiệm
b) Hoại thư lên mũ hoặc di hành	T	T	...	...	...	
2.13.3. Lắng đọng sắc tố trong xương hoặc màng xương	A	A	D	...	Xương D	
2.13.4. Viêm khớp và/hoặc viêm gân						
a) Vô khuẩn hoặc mãn tính không có tác dụng toàn thân	A	A	D	...	...	đối với lợn xem điều 3.3.13
b) Nhiễm trùng cấp (fibrin, có mủ) như viêm đa khớp sơ sinh	T	T	...	...	...	A/A/D/./...Tuỳ theo kết quả xét nghiệm
2.13.5. Can xi hoá xương ức ở bò	A	A	D	...	...	
2.13.6. Bệnh xương gây ra do độc fluor (F)	A	A	D	...	...	
2.14. Bệnh cơ	Không cơ cơ sau chết rigor mortis xem điều 1.12					
2.14.1. Lắng đọng canxi	A	A	D	...	...	

1	2	3	4	5	6	7
2.14.2. Thoái hoá vô khuẩn (như bệnh cơ trắng)	A	A	D	...	...	
2.14.3. Dị tật cơ						
a) Lợn (mỡ không bị ảnh hưởng) như hội chứng stress, thịt mềm tái xanh xuất tiết, hoặc khô đen cứng	A	A	I	...		Nếu vì thương tổn nặng D thay vì I cho các phần mắc bệnh của thân thịt. Vùng bị bệnh D nếu bệnh tích nghiêm trọng, vùng bệnh tích rộng.
b) Động vật khác (như ở bò thịt có miếng cắt tối màu	A	A	I	...	...	Nếu vì thương tổn nặng D thay vì I cho các phần mắc bệnh của thân thịt. Vùng bị bệnh D nếu bệnh tích nghiêm trọng, vùng bệnh tích rộng.
2.15. Bệnh da						
2.15.1. Vết thương và viêm da						
a) Mối bị tạo hạt	A	A	D	...	...	
b) Vết thương chảy nước và nhiễm trùng						
(i) không ảnh hưởng toàn thân	A	A	D	...	...	
(ii) kèm theo sốt hoặc đi hành hoặc nhiễm khuẩn	T	T	...	...	...	
2.15.2. Dập lát						
a) Cục bộ	A	A	D	...	...	
b) Tác dụng toàn thân làm thay đổi thân thịt	T	T	...	...	...	
2.15.3. Bỏng						
a) Cục bộ không ảnh hưởng toàn thân	A	A	D	...	...	
b) Phù nề rộng kèm theo triệu chứng toàn thân như sốt	T	T	...	...	...	
2.15.4. Eczema và viêm da mãn tính (tiền phát)						
a) Cục bộ không có dấu hiệu ảnh hưởng toàn thân	A	A	D	...	...	
2.15.5 Phát ban đỏ và viêm da cấp như do lạnh, cảm nắng, do hoá chất, mẫn cảm ánh sáng						
a) Cục bộ không có dấu hiệu ảnh hưởng toàn thân	A	A	D	...	...	

1	2	3	4	5	6	7
b) Ảnh hưởng toàn thân như sốt	T	T	...	...	...	
3. Danh mục dựa theo bệnh căn						
3.1. Tình trạng do ký sinh trùng						
3.1.1. Giun bao (Trichinella spiralis)	T	T	...	...	...	Trừ các nước không có T spiralis, không kiểm tra giun bao thường xuyên các phương pháp khác phải áp dụng để bảo vệ con người (như xử lý thịt bằng nhiệt, đông lạnh hoặc hoá chất theo quy định)
3.1.2. Gạo bò (Cysticercus bovis)						
a) Nhiễm nặng	T	T	...	...	...	Mức độ nhiễm nặng do cơ quan kiểm tra có thẩm quyền quy định
b) Nhiễm trung bình hoặc nhẹ hoặc một số ít thoái hoá giun bao đã chết	Kf	Kf	...	...	...	Hoặc xử lý nhiệt sao cho nhiệt độ trung tâm miếng thịt đạt 60°C
3.1.3. Gạo lợn (C. cellulosae)						
a) Nhiễm nặng	T	T	...	...	...	Mức độ nhiễm nặng do cơ quan kiểm tra có thẩm quyền quy định.
b) Nhiễm trung bình hoặc nhẹ hoặc giun bao đã chết	Kf	Kf	...	...	...	Hoặc xử lý nhiệt sao cho nhiệt độ trung tâm miếng thịt đạt 60°C
3.1.4. Gạo cừu (C. ovis)						
a) Nhiễm nặng	T	T	...	...	...	Mức độ nhiễm nặng do cơ quan kiểm tra có thẩm quyền quy định
b) Nhiễm trung bình hoặc nhẹ	A	A	...	...	...	Chỉ sau khi đã bỏ phần bị nhiễm. Nếu kinh tế cho phép Kf
3.1.5. Gạo do C tenuicollis	A	A	...	...	...	Nếu điều 1.4 không thích ứng và bệnh tích đã bị cắt bỏ khỏi màng tương
3.1.6. Sán não (Coenurus cerebralis)	A	A	...	D	Não D	
3.1.7. Sán lá gan						
a) Nhiễm nặng	A	A	...	D	...	
b) Nhiễm trung bình hoặc nhẹ	A	A	...	D	...	Phần gan bị hại D; phần còn lại I
3.1.8. Echinococ (Hydatidosis)	A	A	D	D	...	Nếu không áp dụng điều 1.4 phần bị hại D, phần còn lại L hoặc I

1	2	3	4	5	6	7
3.1.9. Giun tròn phổi, dạ dày ruột	A	A	D	...	...	Nếu không áp dụng điều 1.4
3.1.10. Tổn thương gan ruột do ký sinh trùng	A	A	...	D	...	Phần gan bị hại có giới hạn rõ ràng D
3.1.11. Giun xoắn dạ dày ruột ngựa <i>Gastrophilus</i> ngựa	A	A	...	D	...	
3.1.12. <i>Oestrus ovis</i> cừu	A	A	...	D	Đầu D	Có thể chấp nhận L thay vì D nơi có thể được
3.1.13. Dòi da <i>Hypodermosis</i>	A	A	D	...	...	Trừ phi không áp dụng điều 1.4
3.1.14. Ghẻ lở da						
a) Ghẻ lợn						
(i) cục bộ không có tác dụng toàn thân	A	A	D	...	...	
(ii) bệnh tích rộng hoặc có tác dụng toàn thân	Kh	Kh	D	...	...	Trừ phi không áp dụng điều 1.4
b) Ghẻ psoroptic cừu						
(i) cục bộ, không có tác dụng toàn thân	A	A	D	...	...	
(ii) bệnh có mũ ngoài da	T	T	...	...	...	Hoặc Kh tùy theo kết quả xét nghiệm vi trùng
3.2. Bệnh do đơn bào (Protozoa)	Đối với mọi bệnh do đơn bào, T hoặc Kh thay vì A nếu có bất kỳ bệnh tích chung nào trong điều 1 phải áp dụng					
3.2.1. Tim la ngựa	A	A	D	D	...	
3.2.2. Tiên mao trùng	A	A	...	D	...	
3.2.3. Lê dạng trùng (<i>Babesia</i>)	A	A	...	D	...	
3.2.4. Phảy trùng (<i>Theileria</i>)	A	A	...	D	...	
3.2.5. Trùng roi (<i>Trichomonas</i>)	A	A	...	D	...	
3.2.6. Nhục bào tử trùng (<i>Sarcosporidiosis</i>)						
a) Nhiễm nặng	T	T	...	...	...	
b) Nhẹ, cục bộ	A	A	D	D	...	Sau khi bỏ phần có bệnh
3.2.7. <i>Toxoplasma</i>						
a) Có triệu chứng lâm	T	T	...	...	...	

1	2	3	4	5	6	7
sàng hoặc tác dụng toàn thân						
b) chỉ có kết quả huyết thanh học	A	A	...	...	...	
3.2.8. Cầu trùng	A	A	...	D	Ruột D	
3.2.9. Besnoitiosis						
a) Cục bộ không ảnh hưởng toàn thân	A	A	D	D	...	
b) Bệnh tích lan tràn hoặc có tác dụng toàn thân	T	T	...	...	...	
3.3. Tình trạng do vi trùng (gồm cả vi khuẩn có liên quan)						
3.3.1. Nhiệt thán, kể cả động vật và thịt không bị bệnh nhưng nhiễm khuẩn	T	T	...	...	...	Động vật mắc bệnh không được phép đưa đến lò mổ. Nếu phát hiện trước hoặc sau giết mổ phải tiêu độc chuồng trại kỹ lưỡng, tránh gây bệnh cho nghề nghiệp.
3.3.2. Ung khí thán	T	T	...	...	...	
3.3.3. Braxy (Cl. Septicum)	T	T	...	...	...	
3.3.4. Nhiễm độc ruột do Cl. perfringes	T	T	...	...	...	
3.3.5. Phù ác tính (Cl. Septicum vv...)	T	T	...	...	...	
3.3.6. Uốn ván	T	T	...	...	...	
3.3.7. Độc thịt (botulism)	T	T	...	...	...	
3.3.8. Lao	Thịt bò nhiễm lao bị loại khỏi lưu thông quốc tế					
a) Trâu, bò						
(i) Trường hợp bị lao hoặc dương tính sau thí đã kết thúc chương trình thanh toán bệnh lao	T	T	...	...	...	
(ii) vào giai đoạn cuối của chương trình thanh toán lao và nơi tỷ lệ nhiễm lao thấp						
- Phản ứng dương tính không có bệnh tích	Kh	Kh	...	...	Phổi và vú D	Hoặc A hoặc L nhưng không cho lưu thông quốc tế
- Chỉ một cơ quan có bệnh tích và không	Kh	Kh	...	D	Phổi và	Trừ phi không áp dụng điều

1	2	3	4	5	6	7
phải lao kê					vú D	1.4, nếu kinh tế cho phép T
- Lao kê hoặc hai cơ quan trở lên có bệnh tích	T	T	...	...	...	
(iii) Khi bắt đầu chương trình thanh toán lao và trong khu vực tỷ lệ lao cao						
- Phản ứng dương tính không có bệnh tích	L	L	...	...	Phổi và vú D	A nếu L về kinh tế không thực hiện được nhưng không lưu thông quốc tế
- Một cơ quan không có bệnh tích lao kê	Kh	Kh	...	D	Phổi và vú D	Trừ phi đã áp dụng điều 1.4
- Hai cơ quan có bệnh tích nhưng không có dấu hiệu toàn thân hoặc lây lan vào máu.	Kh	Kh	...	D	Phổi và vú D	Nếu kinh tế cho phép T hoặc trừ phi đã áp dụng điều 1.4
- Toàn thân	T	T	...	...	...	
- Dấu hiệu lây vào máu	T	T	...	...	...	
b) Lao lợn						
(i) Bệnh tích chỉ có ở họng hoặc hạch màng ruột (lao gia cầm hoặc lao bò)	Kh	Kh	D	D	Ruột D	Vào giai đoạn cuối hoặc đã kết thúc chương trình chống lao hoặc bệnh tích do lao bò: T. hoặc xử lý nhiệt 77°C nếu chỉ có một ổ lao sơ cấp.
(ii) typ lao gia cầm giới hạn ở các hạch dưới hàm	A	A	D	...	Đầu D	
(iii) Bệnh tích lan tràn, hoặc ở các cơ quan khác	T	T	...	...	...	
c) ở loài nhai lại nhỏ và ngựa	T	T	...	...	...	
3.3.9. Phô lao	A	A	...	D	Ruột màng treo ruột D	Khi không áp dụng điều 1.4
3.3.10. Nấm xạ						
a) Chỉ có bệnh tích ở đầu hoặc bệnh tích nhẹ ở phổi	A	A	D	D	...	Khi không áp dụng điều 1.4
b) Bệnh tích lan rộng trong phổi	T	T	...	...	...	

1	2	3	4	5	6	7
3.3.11. Phổ thương hàn	T	T	...	...	...	
3.3.12. Phàn trắng, viêm rốn, viêm khớp và các bệnh nhiễm trùng huyết ở động vật sơ sinh	T	T	...	...	...	
3.3.13. Đóng dấu lợn						
a) Cấp tính có nốt sần đỏ, hoặc sần đỏ loang rộng	T	T	...	...	...	T trước khi mổ vì gây bệnh cho người giết thịt; nếu điều kiện cho phép; hoãn giết mổ để chữa trị
b) Viêm khớp mạn cục bộ hoặc nốt sùi van tim nhưng không có triệu chứng toàn thân	Kh	Kh	D	D	...	Xét nghiệm vi trùng; T nếu bệnh tích không có tính cục bộ, hoặc thấy có chất kháng khuẩn. Xem điều 2.3.2, nếu không có hại cho người giết mổ và tiêu dùng: A
c) Bệnh tích nhẹ ngoài da	Kh	Kh	D	...	...	Hoặc A nếu không có hại cho người giết mổ và tiêu dùng
d) Viêm khớp hoặc da kèm theo hoại tử hoặc triệu chứng toàn thân	T	T	...	...	...	
3.3.14. Bệnh do Listeria	T	T	...	...	...	Chú ý tránh lây nhiễm cho người giết mổ và chế biến thịt
3.3.15. Hạch dưới hàm lợn nhiễm corynebacterium	A	A	D	D	...	Tuỳ theo kết quả xét nghiệm vi trùng
3.3.16. Viêm bã đậu hạch cừu do Corynebacterium	A	A	D	D	Phổ D	Trừ phi kết luận T hoặc Kh theo điều 1.4
3.3.17. Viêm loét hạch ngựa do Corynebacterium	A	A	D	D	...	Khu vực nhiễm ty thư kết luận theo 3.3.18 trừ phi có kết quả xét nghiệm
3.3.18. Ty thư ngựa	T	T	...	...	...	Không cho phép đưa đi giết mổ
3.3.19. Giả ty thư	T	T	...	...	...	
3.3.20. Nhiễm Streptococcus equi	A	A	D	...	...	Trừ phi kết luận T hoặc Kh theo điều 1.4
3.3.21. Sảy thai truyền nhiễm Brucella	Nơi có bệnh, chú ý tránh lây nhiễm cho người giết mổ					
a) Bò	A	A	...	D	Vú, các cơ quan sinh dục và các hạch liên quan D	Nếu nghi do B. melitensis: T hoặc Kh và nếu kinh tế cho phép; Nếu giết do chương trình phòng chống bệnh Brucella: L thay vì A, nếu kinh tế cho phép, dịch tễ học thấy có lý và / hoặc

1	2	3	4	5	6	7
						phòng tránh được lây nhiễm cho người giết mổ và chế biến thịt.
b) Lợn	T	T	...	...	...	Nếu kinh tế không cho phép Kh nhưng vú, cơ quan sinh dục và các hạch liên quan D
c) Cừu, dê, trâu	T	T	...	...	...	T nếu kinh tế không cho phép: Kh hay L nhưng vú, cơ quan sinh dục và các hạch liên quan: D
d) Ngựa	A	A	D	D	...	
3.3.22. Viêm tinh hoàn phụ do B. ovis	A	A	...	D	...	
3.3.23. Bò nhiễm Campylobacter	A	A	...	D	...	
3.3.24. Tụ huyết trùng	Kh	Kh	...	D	...	Trừ phi đã kết luận T theo 1.1 hay 1.4
3.3.25. Tụ huyết trùng trâu bò serotyp 6:B và 6:E	T	T	...	...	...	Không cho phép đưa đi giết mổ
3.3.26. Sốt do vận chuyển						
a) Lâm sàng	T	T	...	...	...	Nếu có thể: hoãn giết mổ chờ hồi phục
b) Đã hồi phục	A	A	...	D	...	
3.3.27. Teo mũi truyền nhiễm	A	A	D	...	...	Nếu có biến dạng xương mặt :D
3.3.28. Nhiễm trùng hoại tử bê (necrobacillo-sis)						
a) Toàn thân	T	T	...	...	...	
b) Cục bộ	Kh	Kh	D	D	đầu D	
3.3.29. Thối chân cừu	A	A	D	...	...	Chú ý phân biệt với lở mồm long móng, xem điều 3.4.1
3.3.30. Viêm da do Dermatophilus congolensis	A	A	D	...	...	Trừ phi không áp dụng điều 1.4
3.3.31. Xoắn khuẩn Lepto	Chú ý tránh lây nhiễm cho người giết mổ					
a) Cấp tính	T	T	...	...	...	
b) Mạn, cục bộ	A	A	...	D	Thận D	
3.3.32. Viêm phổi màng phổi bò lây lan	A	A	...	D	Phổi, màng	Do M. mycoides, subsp.

1	2	3	4	5	6	7
do <i>M.mycoides</i>					phổi D	Mycoides SC
3.3.33. Viêm phổi màng phổi cừu lây lan do <i>Mycoplasma</i>	A	A	...	D	Phổi, màng phổi D	Do <i>Mycoplasma</i> sp biotype F38
3.3.34. Cạn sữa cừu dê do <i>M.agalactiae</i>	A	A	...	D	Bầu vú D	
3.3.35. Tim nước (<i>Cowdria ruminantium</i>)	A	A	...	D	...	T hay Kh bởi theo điều 1.1 trừ phi kết luận
3.3.36. Sốt Q do <i>Coxiella burneti</i>						Chú ý tránh lây lan cho người giết mổ và chế biến thịt
a) Bệnh lâm sàng	T	T	...	...	...	Kh/D/.../D/ vú D nếu cần tận dụng kinh tế
b) Huyết thanh dương tính	A	A	...	...	Vú D	Nếu kỹ thuật và kinh tế cho phép: T hoặc Kh
3.3.37. Biên dạng trùng (<i>Anaplasmo-sis</i>)	A	A	...	D	...	Trừ phi áp dụng điều 1.1; 1.4 hoặc 1.7
3.4. Tình trạng do vi rút	Cần xét nghiệm loại trừ bệnh vi trùng hoặc chất kháng khuẩn, bám sát luật thú y nhất các bệnh bảng A của OIE					
3.4.1. Lở mồm long móng						
a) Tại nước, vùng, tỉnh không có bệnh						
- Động vật mắc bệnh	T	T	...	...	...	Không cho phép đưa đi giết mổ
b) Tại các nước khác	...	...	...	...	...	Kết luận phù hợp với yêu cầu về sinh thú y, chú ý nhiễm trùng thứ cấp và kết quả kiểm tra trước khi giết mổ (xem điều 1.1, 1.6; 1.6 và 3.3.11) các biện pháp thú y tuân theo chính sách thú y quốc gia xem niên yếu hàng năm FAO/WHO/OIE
3.4.2. Viêm miệng mụn nước	A	A	D	D	...	Nếu nghi ngờ là không phải bệnh thì xử lý theo 3.4.1
3.4.3. Rộp mụn nước lợn	T	T	...	...	...	Nếu kinh tế không cho phép T thì kết luận Kh
3.4.4. Bệnh mụn nước lợn	Kh	Kh	D	D	Ruột D	Tại nước đang có chương trình thanh toán: T và không được giết mổ. Nếu nghi ngờ không phải bệnh xử lý theo 3.4.1
3.4.5. Ecthyma của cừu	A	A	...	D	đầu D	Nếu nghi ngờ là không phải bệnh thì xử lý theo 3.4.1
3.4.6. Đậu dê cừu						

1	2	3	4	5	6	7
a) Bệnh lâm sàng	Kh	Kh	D	D	...	Trừ phi kết luận T theo 1.1; L nếu kinh tế không cho phép Kh
b) Đã khỏi	A	A	D	D	...	
3.4.7. Bệnh lâm sàng						
a) Bệnh lâm sàng	Kh	Kh	D	D	...	Trừ phi áp dụng T theo 1.1; L nếu kinh tế không cho phép Kh
3.4.8. Bệnh đậu khác						
a) Đậu ngựa	L	L	D	D	...	
b) Đậu bò	A	A	D	...	Bầu vú D	
c) Đậu lợn	L	L	D	...	Da D	Nếu kinh tế cho phép: I
Bệnh của bò						
3.4.9. Dịch tả bò						
a) Vùng không có bệnh hoặc trong giai đoạn cuối chương trình thanh toán bệnh	T	T	...	...	...	
b) Vùng dịch địa phương	L	D	...	...	...	Trừ phi áp dụng 1.1; L tại nơi có dịch và lưu thông hạn chế vùng có bệnh và có tiêm phòng; Kh nếu kinh tế cho phép
3.4.10. Viêm cata ác tính của bò	I	D	...	...	...	Khi không áp dụng 1.1
3.4.11. Viêm khí quản mũi truyền nhiễm của bò (IBR/IPV)	A	A	...	D	...	Khi không áp dụng 1.1
3.4.12. Tiêu chảy vi rút bò, bệnh niêm mạc (BVD)	A	A	...	D	...	Khi không áp dụng 1.1
3.4.13. Phó cúm bò	A	A	...	D	...	Khi không áp dụng 1.1
3.4.14. Lở cổ bò						
a) Nhiều bệnh tích đại thể	T	T	...	...	...	
b) Chỉ dương tính huyết thanh	A	A	...	...	...	Tuỳ theo tỷ lệ nhiễm (Kh thay vì A nếu kinh tế cho phép)
3.4.15. Viêm xộp não bò (BSE)	T	T	...	...	...	Cần xét nghiệm labo để khẳng định bệnh con vật nghi mắc bệnh này dự trên khảo sát lâm sàng, phải được xử lý phù hợp với các quy định chặt chẽ của cơ quan có thẩm quyền

1	2	3	4	5	6	7
Bệnh lợn						
3.4.16. Dịch tả lợn cổ điển						
a) Mắc bệnh	T	T	...	...	...	Nếu kinh tế không cho phép: Kh(Trừ phi đã áp dụng T theo 1.1)
b) Tiếp xúc lợn bệnh	Kh	D	...	...	...	
3.4.17. Dịch tả lợn châu Phi (mắc và tiếp xúc lợn bệnh)	T	T	...	...	...	Không cho phép đưa đi giết mổ
3.4.18. Bệnh Teschen	Kh	D	...	...	Não tuỷ, ống tiêu hoá D	Trừ phi áp dụng T/T theo điều 1.1 hoặc 1.3
3.4.19. Bệnh Aujeszky						
a) Bệnh lâm sàng	Kh	Kh	D	D	Não tuỷ, sống D	
b) Huyết thanh dương tính	A	A	...	...	...	Kể cả động vật đã tiêm chủng
3.4.20. Cúm lợn	A	A	...	D	Phổi D	Trừ phi đã kết luật T hoặc Kh theo 1.1
Bệnh của loài nhai lại do ve truyền						
3.4.21. Lưỡi xanh (sốt cata của cừu)						
a) Bệnh lâm sàng	T	T	...	...	...	
b) Huyết thanh dương tính	A	A	...	...	...	
3.4.22. Sốt thung lũng Rift						Chú ý bệnh nghề nghiệp
a) Bệnh lâm sàng	T	T	...	...	...	
b) Huyết thanh dương tính	A	A	...	...	Gan, máu D	
3.4.23. Viêm não tuỷ của cừu	A	A	...	...	Não, tuỷ sống D	Trừ phi áp dụng T hoặc Kh theo 1.1
3.4.24. Bệnh cừu Nairobi	A	A	...	D	...	Trừ phi áp dụng T hoặc Kh theo 1.1
3.4.25. Sốt cách nhật	A	A	...	D	...	Sau khi thân nhiệt của động vật bình thường mới giết mổ; ngược lại, T hoặc Kh theo điều 1.1
Bệnh ngựa						
3.4.26. Viêm não tuỷ						
a) Bệnh lâm sàng	T	T	...	...	...	
b) Huyết thanh dương	L	L	...	...	Não, tuỷ	

I	2	3	4	5	6	7
tính					sống D	
3.4.27 Dịch tả ngựa (Pestes equorum)						
a) Bệnh lâm sàng	T	T	...	...	...	
b) Huyết thanh dương tính	L	L	...	...	...	
3.4.28. Viêm mũi phổi ngựa	A	A	...	D	...	Trừ phi áp dụng T hoặc Kh theo 1.1
3.4.29. Cúm ngựa	A	A	...	D	Phổi D	Không được phép vận chuyển khi mắc bệnh cấp tính; giết mổ khẩn cấp nếu phát hiện khi đến lò mổ; T hoặc Kh thay vì A trong trường hợp 1.1
3.4.30. Bẩn huyết						
a) Bệnh lâm sàng	T	T	...	...	...	
b) Phản ứng dương tính	L	L	...	...	...	Với điều kiện không có bệnh tích tìm thấy kiểm tra sau giết mổ, ngược lại T
Bệnh khác						
3.4.31. Bệnh dại						
a) Giết mổ trong vòng 48 giờ sau khi bị cắn	A	A	D	...	...	Chỗ bị cắn và khu vực xung quanh: D phải chú ý đặc biệt đến bệnh nghề nghiệp. Hoặc phải hoãn giết mổ chờ khẳng định
3.4.32. Viêm não Nhật Bản						
a) Lợn	L	L	...	D	Máu não, tuỷ sống, cơ quan sinh dục D	Kinh tế cho phép :Kh; bệnh cấp tính: T
b) Ngựa						
(i) bệnh lâm sàng	T	T	...	...	...	
(ii) huyết thanh dương tính	L	L	...	...	Máu não, tuỷ sống D	Kinh tế cho phép: Kh
3.4.33. Scrapie (chứng ngứa rung)						
a) Bệnh lâm sàng	T	T	...	...	...	
b) Tiếp xúc, thể hệ trước và sau động vật bệnh	L	L	...	...	Xem ghi chú	Kinh tế cho phép: T thay vì L
3.4.34. Lơ cô (không phải của bò)						
a) Nhiều bệnh tích	T	T	...	...	...	

1	2	3	4	5	6	7
b) Huyết thanh dương tính	A	A	...	...	...	Tuỳ theo tỷ lệ nhiễm (Kh thay vì A nếu kinh tế cho phép)
3.5. Hội chứng có nguyên nhân không rõ hoặc không truyền nhiễm						
3.5.1. Bệnh mô hôi	Kh	D	...	...	...	
3.5.2. Liệt do ve.	T	T	...	...	...	L hoặc Kh nếu kinh tế không cho phép T
3.5.3. Khối u						
a) U lành, u xơ, u xơ dây thần kinh liên sườn, thần kinh mạng...	A	A	D	D	...	D cho phần có u có giới hạn rõ một cơ quan, hoặc D toàn bộ cơ quan có u
b) U ác, như carcinome, sarcome kể cả u sắc tố.	T	T	...	...	...	Xét nghiệm khi cần thiết để phân biệt
c) Nhiều u rải rác, u di hành, u lành phân bố trong nhiều cơ quan	T	T	...	...	...	Xét nghiệm khi cần thiết để phân biệt
3.5.4. Rối loạn trao đổi chất, thiếu chất, ngộ độc						
a) Cetosis bovina (xê tôn huyết)	T	T	...	...	...	Hoặc Kh/D hoặc I/D tuỳ theo kết quả xét nghiệm. Nên hoãn mổ chờ cho khỏi
b) Liệt sau đẻ (thiếu canxi...)	T	T	...	...	...	Hoặc Kh/D hoặc I/D tuỳ theo kết quả xét nghiệm. Nên hoãn mổ chờ cho khỏi
c) Thiếu chất khoáng	A	A	D	...	...	Trừ phi không áp dụng điều 1.4
d) Thiếu magiê	T	T	...	...	...	Hoặc Kh/D hoặc I/D tuỳ theo kết quả xét nghiệm. Nên hoãn mổ chờ cho khỏi.
e) Nhiễm độc (cấp và mãn tính)	T	T	...	...	...	Áp dụng cho động vật có triệu chứng lâm sàng hoặc bệnh tích sau giết mổ.
f) Nhiễm độc á cấp tính, mãn tính có kèm theo bệnh thứ cấp (viêm dạ dày ruột, thoái hoá...) đã khỏi	A	A	D	D	...	Phải xét nghiệm để phòng nguy cơ chất độc tồn dư.
g) Vàng da do						
(i) Tan huyết	T	T	...	...	...	
(ii) Nhiễm độc	T	T	...	...	...	
(iii) Tắc (nhẹ mất đi sau 24 giờ)	A	A	...	D	Gan D	Hoặc I nếu xét thấy A không hợp lý.
(iv) Tắc (nghiêm	T	T	...	...	...	

1	2	3	4	5	6	7
trọng)						
(v) Sinh lý (mối đẻ) hoặc do lách gây, vận, nất vv...						
- Màu còn rõ 24 giờ sau giết mổ.	T	T	...	...	...	Hoặc I trong trường hợp nhẹ thấy T không hợp lý.
- Màu mất hết 24 giờ sau giết mổ.	A	A	...	...	...	
h) Viêm sắc tố rải rác ở bề						
(i) Không cắt bỏ được phần viêm	T	T	...	...	...	
(ii) Cắt bỏ được phần viêm	A	A	D	D	...	
3.5.5. Có mặt tồn dư của chất đông hoá	T	T	...	...	...	
3.5.6. Chất tồn dư theo quy định quốc gia hoặc quốc tế vượt quá giới hạn	T	T	...	...	...	Nếu quy định quốc gia cao hơn quốc tế: L không cho buôn bán quốc tế. D nếu chỉ một số cơ quan có hàm lượng cao hơn giới hạn. Chú ý chất kháng khuẩn làm cho xét nghiệm vi trùng không kết luận được
3.6. Độc tố nấm và độc tố nhiễm nấm độc						
3.6.1. Dịch viêm hạch	A	A	D	D	...	Nếu không có kết quả chẩn đoán phân biệt, kết luận theo ty thư 3.3.18
3.6.2. Lợn nhiễm ochratoxin	T	T	...	...	...	Khi hàm lượng ochratoxin trong thận vượt quá 25 mg/kg (xét nghiệm nếu nghi lợn cùng nguồn gốc với lợn bị dị tật bẩm sinh).
3.6.3. Nhiễm aflatoxin	A	A	...	D	Gan, thận bầu vú D	Khi hàm lượng aflatoxin vượt quá 0,001 mg/ kg (xét nghiệm nếu nghi lợn xuất phát từ cùng một trại nuôi có bệnh).
3.6.4. Nhiễm nấm cấp hoặc mạn tính phát hiện trước hoặc sau khi giết mổ	T	T	...	...	...	

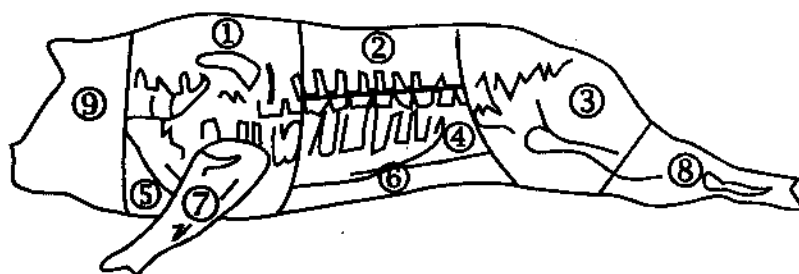
THỊT LỢN

Pha lọc và phân hạng trong thương nghiệp bán lẻ

Pork meat
Cutting and sorting for retail trade

Tiêu chuẩn này áp dụng khi pha lọc và phân hạng thịt lợn trong thương nghiệp bán lẻ.

1. Trước khi pha lọc, thịt lợn phải được cơ quan thú y kiểm tra, cho phép sử dụng và phải theo đúng các quy định khác của Nhà nước.
2. Thịt lợn được pha lọc thành các sản phẩm theo sơ đồ sau:



3. Tên sản phẩm và phân hạng

- 3.1. Các sản phẩm pha lọc được xếp thành ba hạng sau đây:

Hạng 1:

- Thịt mông (3)
- Thịt lưng (2)
- Thịt vai (1)

Hạng 2:

- Thịt ba chỉ (thịt dọi) (4)
- Thịt ngực (thịt nách) (5)

Ban hành theo Quyết định số 308/TC-QĐ, ngày 28/8/1979 của Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước

Hạng 3

- Thịt thủ (9)
- Thịt bụng (6)
- Chân giò trước (7)
- Chân giò sau (8)
- Xương sườn, xương sống.

Các phần pha lọc kể trên có số tương ứng với số ghi trên sơ đồ; các sản phẩm như thịt vai, thịt lưng, thịt mông, thịt ba chỉ, thịt ngực, thịt bụng và thịt thủ là những sản phẩm pha lọc không còn xương, bao gồm toàn bộ những phần nạc, mỡ và da.

- 3.2. Các sản phẩm pha lọc khác không xếp vào ba hạng trên là lưỡi, bầu dục, mỡ lá, thịt vụn, xương thủ, xương bả vai, xương cánh tay, xương chậu, xương đùi, v.v...
- 3.3. Khi cần lọc da, mỡ, nạc của các sản phẩm pha lọc, phải theo những quy định riêng.

4. Giới hạn pha cắt và yêu cầu của sản phẩm.

4.1. Thịt vai

Giới hạn trước: Là đường cắt thủ, cắt thẳng qua khớp giữa xương chằm và đốt sống cổ thứ nhất (cách mang tai khoảng 1cm); mặt cắt phẳng, vuông góc với cột sống, không trơ xương, không rách theo xương hàm.

Giới hạn sau: Là đường cắt vai, qua khoảng giữa đốt sống tương ứng với các xương sườn thứ 7 và thứ 8 và đi qua khoảng giữa các xương sườn đó.

Giới hạn dưới: Bắt đầu từ điểm giữa của đường cắt thủ, lượn theo giới hạn dưới của đường cắt chân giò trước, tới một điểm trên đường cắt vai (khoảng cách từ điểm đó đến lưng gấp hai lần khoảng cách từ điểm đó đến ngực).

4.2. Thịt lưng

Giới hạn trước là đường cắt vai.

Giới hạn sau là đường lưng, cắt thẳng qua góc hông xương cánh chậu, rồi lượn sát vùng cơ mông.

Giới hạn dưới là mép dưới cơ liên sườn chung (con trạch) và cơ dãi lưng.

4.3. Thịt mông

Giới hạn trước: Là đường cắt lưng.

Giới hạn dưới: Là đường cắt chân giò sau.

4.4. Thịt ba chỉ

Giới hạn trước: Là đường cắt vai.

Giới hạn trên: Là giới hạn dưới của thịt lưng.

Giới hạn sau: Là đường cắt lưng.

Giới hạn dưới: Là mép trên cơ thẳng bụng.

4.5. Thịt ngực

Giới hạn trước: Là đường cắt thủ.

Giới hạn trên: Là giới hạn dưới của thịt vai.

Giới hạn sau: Là đường cắt vai.

4.6. Thịt bụng

Giới hạn trước: Là đường cắt vai.

Giới hạn trên: Là giới hạn dưới của thịt ba chỉ.

Giới hạn sau: Là đường cắt lưng.

4.7. Chân giò trước

Cắt từ nách, qua khoảng giữa xương cánh tay, rồi cắt vát lên phía vai. Khi đặt chân giò trên mặt phẳng ngang, mặt cắt quay lên phía trên, mặt cắt phải phẳng, hình bầu dục, không chồi xương hoặc thịt.

4.8. Chân giò sau

Cắt thẳng qua khớp gối (khớp giữa xương đùi và xương chày). Mặt cắt phẳng và vuông góc với xương chày.

5. Lọc xương

5.1. Khi lọc xương sườn và xương sống phải lọc sát xương, nhưng không được khoét thịt ở khoảng giữa các xương sườn. Xương sườn phải giữ nguyên vẹn cả sụn sườn.

5.2. Khi lọc xương thủ, xương bả vai, xương cánh tay, xương chậu và xương đùi, phải lọc sạch thịt.

THỊT LẠNH ĐÔNG

Qui định kỹ thuật

Frozen meat - Specification

TCVN 7047: 2002 thay thế TCVN 5503-91 và điều 1, 2, 4 của TCVN 4377: 1993;

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng cho thịt gia súc, gia cầm và thịt chim, thú nuôi, được cấp đông và bảo quản lạnh đông dùng làm thực phẩm.

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

Quyết định số 178/1999/QĐ - TTg: "Qui chế ghi nhãn hàng hóa lưu thông trong nước và hàng hoá xuất khẩu, nhập khẩu".

TCVN 3699 : 1990 Thủy sản. Phương pháp thử định tính hydro sulphua và amoniac.

TCVN 4833 - 1: 2002 (ISO 3100 - 1: 1991) Thịt và sản phẩm thịt - Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử.

Phần 1: Lấy mẫu

TCVN 4833 - 2 : 2002 (ISO 3100 - 2 : 1988) Thịt và sản phẩm thịt - Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử.

Phần 2: Chuẩn bị mẫu thử để kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 4834:1989 (ST SEV (3016 : 1981) Thịt. Phương pháp và nguyên tắc đánh giá vệ sinh thú y.

TCVN 4835: 2002 (ISO 2917 : 1999) Thịt và các sản phẩm thịt - Đo độ pH - Phương pháp chuẩn.

TCVN 4882: 2001 (ISO 4831 : 1993) Vi sinh vật học. Hướng dẫn chung về định lượng Coliform. Kỹ thuật đếm số có xác xuất lớn nhất.

TCVN 4991: 1989 (ISO 7937 : 1985) Vi sinh vật học. Hướng dẫn chung đếm Clostridium perfringens. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc.

TCVN 4992: 1989 (ISO 7932 : 1987) Vi sinh vật học. Hướng dẫn chung đếm Bacillus cereus. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C.

TCVN 5151: 1990 Thịt và sản phẩm của thịt. Phương pháp xác định hàm lượng chủ.

TCVN 5152: 1990 Thịt và sản phẩm của thịt - Phương pháp xác định hàm lượng thủy ngân.

TCVN 5153: 1990 (ISO 6888 : 1993) Thịt và sản phẩm của thịt. Phương pháp phát hiện Salmonella.

TCVN 5155: 1990 Thịt và sản phẩm của thịt. Phương pháp phát hiện và đếm số Escherichia coli

TCVN 5156 : 1990 Thịt và sản phẩm của thịt. Phương pháp phát hiện và đếm số Staphylococcus aureus.

TCVN 5667 : 1992 Thịt và sản phẩm thịt. Phương pháp xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí.

Ban hành theo quyết định của Bộ Khoa học và Công nghệ.

TCVN 7046 : 2002 Thịt tươi - Quy định kỹ thuật.

ISO 13493:1998 Meat and meat products - Detection of chloramphenicol content - Method using liquid chromatography (thịt và sản phẩm thịt - Phát hiện hàm lượng cloramphenicol - Phương pháp sử dụng sắc ký lỏng).

AOAC 945.58 Cadmium in food - Dithizone method (cadimi trong thực phẩm - Phương pháp dithizon)

AOAC 956.10 Diethylstilbestrol in feeds - Spectrophotometric method (Diethylstilbestrol trong thức ăn gia súc - Phương pháp quang phổ)

AOAC 995.09: Chlortetracycline, Oxytetracycline, and tetracycline in Edible animal Tissues - Liquid chromatographic method (Clotetraxyclin, oxytetraxyclin, và tetraxyclin trong thức ăn gia súc - Phương pháp sắc ký lỏng).

AOAC 977.26 Clostridium botulinum and its toxin in foods - Microbiological method (Clostridium botulinum và độc tố của chúng trong thực phẩm - Phương pháp vi sinh vật học).

3. Định nghĩa

3.1. **Thịt lạnh đông (Frozen meat):** Thịt tươi được cấp đông và bảo quản ở nhiệt độ tâm sản phẩm không cao hơn - 12°C.

4. Yêu cầu kỹ thuật

4.1. Nguyên liệu

- Thịt tươi, theo quy định của TCVN 7046 : 2002;
- Không được sử dụng thịt đã cấp đông.

4.2. Yêu cầu cảm quan

Yêu cầu cảm quan của thịt lạnh đông được quy định trong bảng 1.

Bảng 1- Yêu cầu cảm quan của thịt lạnh đông

Tên chỉ tiêu	Yêu cầu
Trạng thái lạnh đông	
Trạng thái bên ngoài	- Khối thịt đông cứng, lạnh, dính tay, bề mặt khô, gõ có tiếng vang, cho phép có ít tuyết trên bề mặt ngoài của khối thịt. - Khối thịt sạch, không có tạp chất lạ, không có băng đá, không được rã đông.
Màu sắc	Đặc trưng cho từng loại sản phẩm
Trạng thái sau rã đông	
Trạng thái bên ngoài	- Đàn hồi, bề mặt không bị nhót, không dính tạp chất lạ. - Mỡ mềm, rai, định hình.
Màu sắc	Đặc trưng cho từng loại sản phẩm.
Mùi	Tự nhiên, đặc trưng cho từng loại sản phẩm, không có mùi lạ.
Trạng thái sau khi luộc chín	
Mùi	Đặc trưng cho từng loại sản phẩm, không có mùi lạ.
Vị	Ngọt, đặc trưng cho từng loại sản phẩm.
Nước luộc thịt	Trong, vàng mỡ to

4.3. Các chỉ tiêu lý hóa

Các chỉ tiêu lý hóa của thịt lạnh đông được quy định trong bảng 2.

Bảng 2 - Các chỉ tiêu lý hóa của thịt lạnh đông

Tên chỉ tiêu	Yêu cầu
1. Độ pH	5,5 - 6,2
2. Phản ứng định tính dihydro sulphua (H_2S)	âm tính
3. Hàm lượng amoniac, mg/100 g, không lớn hơn	35
4. Độ trong của nước luộc thịt khi phản ứng với đồng sunfat ($CuSO_4$)	cho phép hơi đục

4.4. Dư lượng các kim loại nặng

Dư lượng các kim loại nặng trong thịt lạnh đông được quy định trong bảng 3.

Bảng 3 - Dư lượng các kim loại nặng trong thịt lạnh đông

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa (mg/kg)
1. Chì (Pb)	0,5
2. Cadimi (Cd)	0,05
3. Thủy ngân (Hg)	0,03

4.5. Các chỉ tiêu vi sinh vật

Các chỉ tiêu vi sinh vật của thịt lạnh đông được quy định trong bảng 4.

Bảng 4 - Các chỉ tiêu vi sinh vật của thịt lạnh đông

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa
1. Tổng số vi sinh vật hiếu khí, số khuẩn lạc trong 1g sản phẩm	10^6
2. <i>E.coli</i> , số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	10^2
3. <i>Coliforms</i> , số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	10^2
4. <i>Salmonella</i> , số vi khuẩn trong 25 g sản phẩm	0
5. <i>B. cereus</i> , số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	10^2
6. <i>Staphylococcus aureus</i> , số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	10^2
7. <i>Clostridium botulinum</i> , số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	0
8. <i>Clostridium perfringens</i> số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	10

4.6. Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật

Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật của thịt lạnh đông được quy định trong bảng 5.

Bảng 5- Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật của thịt lạnh đông

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa (mg/kg)
1. Cabaryl	0,0
2. DDT	0,1
3. 2,4 D	0,0
4. Lindan	0,1
5. Triclophon	0,0
6. Diclovos	0,0
7. Diazinon	0,7
8. Fenclophos	0,3
9. Clopyrifos	0,1
10. Cuomaphos	0,2

4.7. Dư lượng thuốc thú y

Dư lượng thuốc thú y của thịt lạnh đông được quy định trong bảng 6.

Bảng 6 - Dư lượng thuốc thú y của thịt lạnh đông

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa (mg/kg)
1. Họ tetraxylin	0,1
2. Họ cloramphenicol	Không phát hiện

4.8. Độc tố nấm mốc

Hàm lượng aflatoxin B₁ của thịt lạnh đông không lớn hơn 0,005 mg/kg

4.9. Dư lượng hoocmon

Dư lượng hoocmon của thịt lạnh đông được quy định trong bảng 7.

Bảng 7 - Dư lượng hoocmon của thịt lạnh đông

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa (mg/kg)
1. Diethylstylbestrol	0,0
2. Testosterol	0,015
3. Estadiol	0,0005

5. Phương pháp thử

- 5.1. Lấy mẫu theo TCVN 4833 - 1 : 2002 (ISO 3100 - 1 : 1991) và TCVN 4833 - 2 : 2002 (ISO 3100 - 2 : 1988)
- 5.2. Thử định tính dihydro sulphua (H₂S) theo TCVN 3699 : 1990.
- 5.3. Xác định hàm lượng amoniac (NH₃) theo TCVN 4834:1989 (ST SEV 3016 : 1981)

- 5.4. Xác định pH theo TCVN 4835 : 2002 (ISO 2917 : 1999).
- 5.5. Xác định Coliforms theo TCVN 4882 : 2001 (ISO 4831 : 1993).
- 5.6. Xác định Clostridium perfringens theo TCVN 4991 : 1989 (ISO 7937 : 1985).
- 5.7. Xác định Bacillus cereus theo TCVN 4992 : 1989
- 5.8. Xác định Clostridium botulinum theo AOAC 977.26.
- 5.9. Xác định hàm lượng cadimi theo AOAC 945.58.
- 5.10. Xác định hàm lượng chì theo TCVN 5151 : 1990.
- 5.11. Xác định hàm lượng thủy ngân theo TCVN 5152 : 1990.
- 5.12. Xác định Salmonella theo TCVN 5153 : 1990 (ISO 6888 : 1993).
- 5.13. Xác định E.coli theo TCVN 5155 : 1990.
- 5.14. Xác định S.aureus theo TCVN 5156 : 1990.
- 5.15. Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí theo TCVN 5667 : 1992.
- 5.16. Xác định cloramphenicol theo ISO 13493 : 1998.
- 5.17. Xác định họ tetracyclin theo AOAC 995.09.
- 5.18. Xác định hoocmon (diethylstilbestrol) theo AOAC 956.10.

6. Ghi nhãn, bao gói, vận chuyển và bảo quản

6.1. Ghi nhãn

Theo "Qui chế ghi nhãn hàng hoá lưu thông trong nước và hàng hoá xuất khẩu, nhập khẩu" ban hành kèm theo Quyết định số 178/1999/QĐ - TTg.

6.2. Bao gói

Thịt lạnh đông được đựng trong bao bì chuyên dùng cho thực phẩm, không ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm.

6.3. Vận chuyển

Thịt lạnh đông được vận chuyển trong xe chuyên dùng và trong quá trình vận chuyển phải đảm bảo nhiệt độ của tâm sản phẩm không cao hơn - 12°C. Xe phải làm vệ sinh, khử trùng trước khi sử dụng và theo quy định.

6.4. Bảo quản

Thời gian bảo quản thịt lạnh đông không được quá 18 tháng tính từ ngày sản xuất.

Thịt lạnh đông phải bảo quản trong kho chuyên dùng, nhiệt độ tâm sản phẩm phải không cao hơn -12°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Quyết định số 867/1998/QĐ-BYT của Bộ Y tế về "Danh mục tiêu chuẩn vệ sinh đối với lương thực, thực phẩm".

LỢN SỮA LẠNH ĐÔNG XUẤT KHẨU

The exported frozen suckling pig

1. Phạm vi áp dụng

1.1. Tiêu chuẩn này:

- Qui định yêu cầu kỹ thuật, phương pháp thử, bao gói, ghi nhãn, bảo quản, vận chuyển lợn sữa lạnh đông xuất khẩu;
- Được áp dụng cho các cơ sở tham gia xuất khẩu lợn sữa lạnh đông thuộc mọi thành phần kinh tế trong phạm vi cả nước.

1.2. Lợn sữa lạnh đông xuất khẩu phải sản xuất theo đúng qui trình công nghệ đã được cơ quan có thẩm quyền phê duyệt.

2. Yêu cầu kỹ thuật

2.1. Nguyên liệu:

2.1.1. Lợn sữa được sản xuất từ lợn con thương phẩm: lợn nội hoặc lợn ngoại lai nội, có độ tuổi từ 30 đến 60 ngày, khối lượng lợn hơi phải đạt từ 3,0 đến 9,0 kg và có đủ điều kiện về vệ sinh thú y theo qui định của Pháp lệnh Thú y.

2.1.2. Ngoại hình:

- + Phải có lông màu đặc trưng của giống, bộ bấm, lông mượt, da bóng, nguyên đuôi;
- + Không dùng những con lợn bị bệnh ngoài da, bấm tím, gãy xương, dị dạng.

2.1.3. Vận chuyển:

- Lợn phải được vận chuyển nhẹ nhàng. Xe vận chuyển phải rộng rãi, thoáng mát, đảm bảo vệ sinh thú y;
- Không vận chuyển lợn vào thời gian nắng nóng.

2.1.4. Phải thực hiện đầy đủ các qui định của Pháp lệnh Thú y khi đưa lợn vào giết mổ.

2.2. Thành phẩm:

Các chỉ tiêu chất lượng của lợn sữa lạnh đông xuất khẩu được qui định trong bảng sau đây:

Chỉ tiêu	Yêu cầu
2.2.1. Cảm quan: 2.2.1.1. Trạng thái lạnh đông a) Dạng bên ngoài	- Một khối định hình, tròn, gọn, đẹp tự nhiên, 2 chân trước và 2 chân sau thu gọn và gập vào nhau; - Lợn phải sạch, khô, khi gõ đánh và có tiếng vang, tuỷ ở xương ống phải đông cứng;

	- Trên da tại vùng mông phải có dấu kiểm soát giết mổ của Trung tâm Thú y vùng và số hiệu của cơ sở sản xuất đã được nước nhập khẩu chấp nhận; - Cho phép có ít tuyết trên bề mặt và ít dịch ở phía dưới bụng. - Không cho phép: + Bị cháy lạnh, băng đá, biến dạng, nấm mốc, vết nhò đen và tạp chất lạ; + Được cấp đông trên một lần và bị rã đông.
b) Màu sắc	Da màu trắng hồng tự nhiên của sản phẩm; Dịch ở phía bụng phải có màu hồng đỏ tươi; Không cho phép da bị biến màu, dịch có màu đỏ sẫm.
2.2.1.2. Trạng thái giải đông	
a) Dạng bên ngoài	- Phải loại bỏ hết lông, móng chân ngoài, làm sạch tai, răng, lưỡi; - Đường mổ bụng phải cách nốt chấm ở hàm ếch từ 1-2cm và thẳng đến hậu môn; - Lợn phải nguyên hình dạng, sạch, chỉ bỏ nội tạng, nhưng để nguyên động mạch chủ, thận, màng thận và đuôi; - Không cho phép sót lông, da bị rách, xây xước, thịt bị bầm tím, gãy xương, gãy đuôi, gãy tai và có tạp chất lạ.
b) Trạng thái	- Thịt phải chắc, dai và có tính đàn hồi tốt, sau khi ấn ngón tay không để lại dấu lún trên bề mặt thịt; - Mỡ định hình mềm dai, da dai.
c) Màu sắc	- Thịt màu hồng đỏ tươi, đặc trưng màu của sản phẩm ; - Mỡ màu trắng đục; - Da màu trắng tự nhiên của sản phẩm; - Tủy ở xương ống màu hồng nhạt; - Không cho phép thịt, da, mỡ, tủy bị biến màu.
2.2.1.3. Trạng thái làm chín:	
a) Mùi, vị	- Mùi thịt thơm và vị ngọt đậm đặc trưng với sản phẩm; - Không cho phép có mùi ôi, chua khét và mùi vị lạ khác.
b) Nước luộc thịt	Phải trong và có váng mỡ to.
2.2.2. Lý, hoá:	
a) Nhiệt độ ở sâu 4cm của sản phẩm không cao hơn	(- 12°C)
b) Khối lượng tịnh mỗi con sau khi cấp đông	Từ 2,0 đến 6,0 kg
c) Hàm lượng amoniac, axit bay hơi, độ PH, phản ứng nước luộc thịt với đồng sunfat:	Theo TCVN: 4377-1993.
2.2.3. Các chỉ tiêu vệ sinh thực phẩm.	Phải đáp ứng yêu cầu vệ sinh an toàn thực phẩm của nước nhập khẩu.

3. Phương pháp thử

Theo TCVN: 4377- 1993.

4. Bao gói, ghi nhãn, bảo quản, vận chuyển.

4.1. Bao gói:

4.1.1. Bao bì: Phải đạt các yêu cầu chất lượng theo qui định sau đây:

a)Màng mỏng Polyetylen (PE): phải làm từ nhựa nguyên sinh, dai, màu trắng trong dùng để bao gói và bảo quản sản phẩm lạnh đông ở nhiệt độ không cao hơn (-18°C)

b) Thùng carton:

+ Phải làm bằng carton làn sóng 5 lớp, mỗi thùng có 2 đệm lót làm bằng carton làn sóng 3 lớp, 2 mặt ngoài của thùng và đệm lót đều phải tráng parafin;

+ Phải khô, sạch, không mốc, xước, hoen, ố. Lớp sấp trên hai mặt thùng và đệm lót phải đều khắp, không có mùi hôi, không bị thấm nước. Các góc phải vuông vắn, vết cắt không xơ xước, hai nắp lớn khi ghép lại phải khít nhau.

+ Toàn bộ hai mặt thùng phải bằng phẳng, không bong, rộp. Độ kết dính của các lớp giấy phải bền, chắc ở nhiệt độ không cao hơn (-18°C).

+ Mép thùng phải rộng 5cm, ghép bằng ghim, khoảng cách giữa các ghim phải đều nhau. Ghim ghép thùng phải đảm bảo không bị gỉ trong điều kiện ẩm ướt;

+ Kích thước của thùng phụ thuộc vào số con và khối lượng lợn sữa cần đóng gói trong mỗi thùng;

c) Đai nẹp được làm từ nhựa dai, dây đai phải mỏng, không bị dòn gãy khi ở nhiệt độ không cao hơn (-18°C).

4.1.2. Đóng gói:

- Từng con lợn được gói chặt trong màng mỏng PE;

- Số con và khối lượng tịnh trong mỗi thùng carton được đóng gói theo yêu cầu của khách hàng;

- Mỗi thùng được đai nẹp hai đai ngang và hai đai dọc đảm bảo chắc chắn trong quá trình vận chuyển hàng hoá.

4.2. Ghi nhãn:

- Nhãn hiệu trên thùng carton phải in rõ ràng bằng loại mực không phai nhòe, không ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm;

- Nội dung ký mã hiệu và ngôn ngữ ghi nhãn theo Quyết định số 178/1999/QĐ-TTg ban hành ngày 30 tháng 8 năm 1999 của Thủ tướng Chính phủ về Quy chế ghi nhãn hàng hoá lưu thông trong nước và hàng hoá xuất khẩu, nhập khẩu;

- Trên mỗi thùng lợn sữa lạnh đông ngoài ra phải ghi thêm như sau:

+ Số hiệu của cơ sở sản xuất đã được đăng ký với nước nhập khẩu;

+ Số lượng lợn sữa lạnh đông được sản xuất trong một ngày của lô hàng.

4.3. Bảo quản:

Lợn sữa lạnh đông phải được bảo quản trong kho lạnh chuyên dùng, đảm bảo vệ sinh và không có mùi lạ. Nhiệt độ phòng kho lạnh trong khi bảo quản hàng phải đạt từ (-18°C) đến (-22°C). Hàng xếp trong kho lạnh phải có bục kê cách mặt sàn 0,3 mét, cách tường 0,5 mét, cách dàn lạnh 0,5 mét và có hàng lối để không khí lạnh lưu chuyển tiếp xúc đều với sản phẩm. Các thùng lợn sữa được phép xếp chồng lên nhau nhưng không cao hơn 2,5 mét và phía trên cùng được phủ kín bằng bạt chất dẻo.

4.4. Vận chuyển:

Lợn sữa lạnh đông phải bốc xếp nhẹ nhàng, cẩn thận, được vận chuyển bằng xe lạnh, container lạnh, tàu lạnh chuyên dùng, đảm bảo vệ sinh và không có mùi lạ. Nhiệt độ phòng lạnh của xe, container lạnh, hầm lạnh của tàu trong quá trình vận chuyển phải đạt từ (-18°C) đến (-22°C).

LỢN CHOAI LẠNH ĐÔNG XUẤT KHẨU

The frozen high lean meat medium pig for export

1. Phạm vi áp dụng

1.1. Tiêu chuẩn này

- Quy định yêu cầu kỹ thuật, phương pháp thử, bao gói, ghi nhãn, bảo quản, vận chuyển lợn choai lạnh đông xuất khẩu;
- Được áp dụng cho các cơ sở tham gia xuất khẩu lợn choai lạnh đông thuộc mọi thành phần kinh tế trong phạm vi cả nước cả nước.

1.2. Lợn choai lạnh đông xuất khẩu phải sản xuất theo đúng qui trình công nghệ đã được cơ quan có thẩm quyền phê duyệt.

2. Yêu cầu kỹ thuật

2.1. Nguyên liệu

- 2.1.1.** Lợn choai lạnh đông xuất khẩu được chế biến từ lợn sống, lấy từ giống lợn thương phẩm ngoại thuần và nhiều máu ngoại, có độ tuổi không quá 120 ngày và có khối lượng hơi từ 34 đến 47kg, đảm bảo đầy đủ điều kiện vệ sinh thú y theo qui định của Pháp lệnh Thú y.
- 2.1.2.** Ngoại hình: Lợn phải có lông mượt, mắt trắng, chân cao, không bị bệnh ngoài da, bầm tím và gãy xương.
- 2.1.3.** Lợn phải được thu mua, vận chuyển nhẹ nhàng. Xe vận chuyển lợn phải thoáng mát, đảm bảo vệ sinh. Không vận chuyển lợn vào thời gian nắng nóng.
- 2.1.4.** Lợn trước khi đưa vào giết mổ phải theo qui định của Pháp lệnh Thú y.

2.2. Thành phẩm

Các chỉ tiêu chất lượng của lợn choai lạnh đông xuất khẩu được qui định trong bảng sau đây:

Chỉ tiêu	Yêu cầu
2.2.1. Cảm quan: 2.2.1.1. Trạng thái lạnh đông a. Dạng bên ngoài	- Phải định hình gọn, đẹp, 2 chân sau gấp khúc và song song với mình, hai chân trước quay về phía sau hoặc về phía trước (theo yêu cầu của khách hàng); - Sản phẩm phải sạch, một khối định hình đông cứng, đàn hồi, khi gõ có tiếng vang, tuỷ ở xương ống phải đông cứng; - Trên da tại vùng mông của lợn phải có dấu kiểm soát giết mổ của Trung tâm Thú y vùng và ký hiệu của cơ sở sản xuất đã được nước nhập khẩu chấp nhận;

	- Cho phép có tuyết rải rác trên bề mặt; - Không được phép: + Biến dạng do cấp đông, có băng đá, cháy lạnh, tiết dịch, nấm mốc, vết nhò đen và tạp chất lạ; + Cấp đông trên một lần, bị rã đông.
b. Màu sắc	- Da có màu trắng đến trắng hồng; - Mỡ có màu trắng đục; - Thịt màu hồng đỏ tươi; - Không cho phép sản phẩm bị biến màu.
2.2.1.2. trạng thái giải đông	
a. Dạng bên ngoài	- Phải loại bỏ hết lông, móng chân ngoài và làm sạch tai, răng, lưỡi; - Đường mổ bụng thẳng từ đầu đến hậu môn. Bỏ nội tạng, mỡ lá nhưng để nguyên đuôi, lưỡi và tai; - Phải xẻ dọc chính giữa xương sống từ đầu thẳng đến xương cùng, phanh hàm ếch, bỏ óc và tuỷ sống nhưng không làm đứt da; - Không cho phép: thịt bị bầm dập, tụ máu, rách da xây xước, bệnh ngoài da, sốt lông, gãy đuôi, gãy tai, gãy lưỡi, gãy xương và có tạp chất lạ.
b. Trạng thái	- Thịt phải chắc, dai, có độ đàn hồi, khi ấn ngón tay vết lún mất đi từ từ và không để lại dấu lún trên bề mặt. Mặt thịt mịn, không ươn; - Mỡ định hình, mịn, mềm, dai; - Da dai; - Không cho phép thịt có mô cơ bị nhão và ươn.
c. Màu sắc	- Da phải có màu trắng đến phớt hồng; - Mỡ màu trắng đục; - Tuỷ ở xương ống màu hồng nhạt; - Thịt màu hồng đến đỏ tươi đặc trưng của sản phẩm thịt lạnh đông; - Không cho phép thịt bị biến thành màu xám, mỡ màu vàng, da màu vàng và vàng nâu.
2.2.1.3. Trạng thái khi làm chín.	
a. Mùi, vị	- Thịt thơm, ngọt đậm đặc trưng của sản phẩm thịt lạnh đông; - Không cho phép thịt có mùi chua, ôi, khét và mùi lạ.
b. Nước luộc	- Trong, có váng mỡ to.
2.2.2. Lý, hoá:	
2.2.2.1. Khối lượng tịnh mỗi con sau khi cấp đông	Từ 20 đến 32kg.
2.2.2.2. Nhiệt độ ở độ sâu 6 cm	

của sản phẩm không cao hơn.	-12°C.
2.2.2.3. Hàm lượng amoniac (NH ₃), axit bay hơi, độ PH, phản ứng nước luộc thịt với đồng sunfat.	Theo TCVN: 4377 - 1993
2.2.3. Vệ sinh thực phẩm.	Phải đáp ứng các chỉ tiêu vệ sinh an toàn thực phẩm của nước nhập khẩu.

3. Phương pháp thử

Theo TCVN 4377 - 1993.

4. Bao gói, ghi nhãn, bảo quản, vận chuyển

4.1. Bao gói

4.1.1. Bao bì:

- a) Túi Pôlyetylen (PE) được sản xuất từ nhựa nguyên sinh, màu trắng trong, dai, sạch, đảm bảo vệ sinh, không có mùi lạ, dùng để bao gói sản phẩm lạnh đông ở nhiệt độ không cao hơn (-18°C).
- b) Bao Pôlyprôtylen (PP) được sản xuất từ nhựa nguyên sinh, màu trắng, sạch, đảm bảo vệ sinh và không có mùi lạ.

4.1.2. Bao gói:

Mỗi sản phẩm được bao gói trong túi PE, ngoài bao PP buộc hoặc khâu kín.

4.2. Ghi nhãn

- Nhãn hiệu trên bao PP phải rõ ràng và in loại mực có độ bám dính tốt ở (-18°C) đến (-22°C), không có mùi làm ảnh hưởng chất lượng của sản phẩm:
- Nội dung ghi nhãn và ngôn ngữ sử dụng trên nhãn thực hiện theo Quyết định số 178/1999/QĐ-TTg, ngày 30 tháng 8 năm 1999 của Thủ tướng Chính phủ ban hành về Quy chế ghi nhãn hàng hoá lưu thông trong nước và hàng hoá xuất khẩu, nhập khẩu.

Trên bao PP phải ghi thêm như sau:

- + Số hiệu của cơ sở sản xuất đã được nước nhập khẩu chấp nhận;
- + Số lượng lợn choai đã sản xuất trong một ngày của lô hàng.

4.3. Bảo quản

- Lợn choai lạnh đông phải được bảo quản trong kho lạnh đông chuyên dùng, đảm bảo vệ sinh và không có mùi lạ. Nhiệt độ phòng kho lạnh trong quá trình bảo quản phải đạt từ (-18°C) đến (-22°C).
- Kho lạnh phải có bậc kê cách mặt sàn của kho 0,3m và xếp hàng cách tường 0,5m cách dàn lạnh 0,5m có hàng lối để đảm bảo việc lưu chuyển không khí lạnh tiếp xúc đều với sản phẩm.

4.4. Vận chuyển

- Sản phẩm lợn choai được bốc xếp nhẹ nhàng, phải được vận chuyển bằng xe lạnh, container lạnh, tàu lạnh chuyên dùng, đảm bảo vệ sinh và không có mùi lạ.
- Nhiệt độ Phòng lạnh của xe, container lạnh, hầm lạnh của tàu trong quá trình vận chuyển phải đạt từ (-18°C) đến (-22°C).

THỊT HỘP
Quy định kỹ thuật
Canned meat - Specification

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng cho đồ hộp thịt gia súc, gia cầm và thịt chim, thú nuôi.

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

Quyết định số 3742/2001/QĐ-BYT: "Qui định danh mục các chất phụ gia được phép sử dụng trong thực phẩm".

Quyết định số 178/1999/QĐ - TTg: "Qui chế ghi nhãn hàng hoá lưu thông trong nước và hàng hóa xuất khẩu, nhập khẩu".

TCVN 1981 : 1988 Đồ hộp. Xác định hàm lượng thiếc bằng phương pháp chuẩn độ.

TCVN 4991 : 1989 (ISO 7937 : 1985) Vi sinh vật học. Hướng dẫn chung đếm *Clostridium perfringens*. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc.

TCVN 5151: 1990 Thịt và sản phẩm thịt. Phương pháp xác định hàm lượng chì.

TCVN 5152 : 1990 Thịt và sản phẩm thịt. Phương pháp xác định hàm lượng thủy ngân.

TCVN 5155 : 1990 Thịt và sản phẩm thịt. Phương pháp phát hiện và đếm số *Escherichia coli*.

TCVN 5156 : 1990 Thịt và sản phẩm thịt. Phương pháp phát hiện và đếm số *Staphylococcus aureus*.

TCVN 5166 : 1990 Sản phẩm thực phẩm. Phương pháp xác định tổng số bào tử, nấm men, nấm mốc.

TCVN 7046 : 2002 Thịt tươi - Qui định kỹ thuật.

TCVN 7047 : 2002 Thịt lạnh đông - Qui định kỹ thuật.

ISO 13493 : 1998 Meat and meat products - Detection of chloramphenicol content - Method using liquid chromatography (Thịt và sản phẩm thịt - Phát hiện hàm lượng cloramphenicol - Phương pháp sử dụng sắc ký lỏng).

AOAC 945.58 Cadmium in food - Dithizone method (cadimi trong thực phẩm - Phương pháp dithizon).

AOAC 956.10 Diethylstilbestrol in feeds - Spectrophotometric method (Diethylstilbestrol trong thức ăn gia súc - Phương pháp quang phổ).

AOAC 995.09 Chlortetracycline, Oxytetracycline, and tetracycline in Edible Animal Tissues -

Liquid chromatographic method (Clotetraxyclin, oxytetraxyclin, và tetraxyclin trong thức ăn gia súc - Phương pháp sắc ký lỏng).

AOAC 977.26 Clostridium botulinum and Its toxin in foods - Microbiological method (Clostridium botulinum và độc tố của chúng trong thực phẩm - Phương pháp vi sinh vật học).

3. Định nghĩa

3.1. **Thịt hộp (canned meat):** Thịt đã qua chế biến, được đóng trong hộp kín và được thanh trùng.

4. Yêu cầu kỹ thuật

4.1. Nguyên liệu

- Thịt tươi, theo quy định của TCVN 7046 : 2002 và/hoặc
- Thịt lạnh đông, theo quy định của TCVN 7047 : 2002

4.2. Yêu cầu cảm quan

Yêu cầu cảm quan của thịt hộp được quy định trong bảng 1

Bảng 1: Yêu cầu cảm quan của thịt hộp

Tên chỉ tiêu	Yêu cầu
1. Trạng thái	Đặc trưng cho từng loại sản phẩm
2. Màu sắc	Đặc trưng cho từng loại sản phẩm
3. Mùi, vị	Đặc trưng cho từng loại sản phẩm, không có mùi lạ và có mùi thơm của gia vị

4.3. Các chỉ tiêu lý hóa

Các chỉ tiêu lý hóa của thịt hộp được quy định trong bảng 2

Bảng 2 - Chỉ tiêu lý hóa của thịt hộp

Tên chỉ tiêu	Giới hạn cho phép
1. Chỉ số peroxyt, số mililit natri thia sulphua ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,002 N dùng để trung hòa hết lượng peroxyt trong 1 kg, không lớn hơn	5
2. Tỷ lệ "cái/nước"	Theo tiêu chuẩn đã được công bố của nhà sản xuất

4.4. Yêu cầu bên trong của hộp sau khi mở

Đối với loại bao bì không tráng vecni, mặt trong cho phép có vết đen nhẹ. Đối với loại bao bì tráng vecni, mặt trong không được có bọt, vết nứt, lớp vecni phủ đều, không bị bong.

4.5. Dư lượng kim loại nặng

Dư lượng kim loại nặng của thịt hộp được quy định trong bảng 3

Bảng 3 - Dư lượng kim loại nặng của thịt hộp

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa (mg/kg)
1. Chì (Pb)	0,5
2. Cadimi (Cd)	0,05
3. Thiếc (Sn)	250
4. Thủy ngân (Hg)	0,03

4.6. Các chỉ tiêu vi sinh vật

Các chỉ tiêu vi sinh vật của thịt hộp được quy định trong bảng 4

Bảng 4 - Các chỉ tiêu vi sinh vật của thịt hộp

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa
1. Tổng số nấm men - nấm mốc, số khuẩn lạc trong 1g sản phẩm	0
2. E.coli, số vi khuẩn trong 1g sản phẩm	0
3. Staphylococcus aureus, số vi khuẩn trong 1g sản phẩm	0
4. Clostridium perfringens, số vi khuẩn trong 1g sản phẩm	0
5. Clostridium botulinum, số vi khuẩn trong 1g sản phẩm	0

4.7. Dư lượng thuốc thú y

Dư lượng thuốc thú y của thịt hộp được quy định trong bảng 5

Bảng 5 - Dư lượng thuốc thú y của thịt hộp

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa (mg/kg)
1. Họ tetracyclin	0,1
2. Họ cloramphenicol	Không pháp hiện

4.8. Dư lượng hoocmon

Dư lượng hoocmon của thịt hộp được quy định trong bảng 6.

Bảng 6 - Dư lượng hoocmon của thịt hộp

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa (mg/kg)
1. Diethylstilbestrol	0,0
2. Testosterol	0,015
3. Estadiol	0,0005

4.9. Độc tố nấm mốc

Hàm lượng aflatoxin B₁ của thịt hộp không lớn hơn 0,005 mg/kg.

4.10. Phụ gia thực phẩm

Phụ gia thực phẩm: Theo “Qui định danh mục các chất phụ gia được phép sử dụng trong thực phẩm” ban hành kèm theo Quyết định số 3742/2001/QĐ-BYT.

5. Phương pháp thử

- 5.1. Xác định *Clostridium perfringens* theo TCVN 4991: 1989 (ISO 7937: 1985).
- 5.2. Xác định *Clostridium botulinum* theo AOAC 977.26.
- 5.3. Xác định tổng số bào tử nấm men, nấm mốc theo TCVN 5166 : 1990.
- 5.4. Xác định *E. coli* theo TCVN 5155 : 1990.
- 5.5. Xác định *S.aureus* theo TCVN 5156 : 1990.
- 5.6. Xác định hàm lượng chì theo TCVN 5151: 1990.
- 5.7. Xác định hàm lượng thủy ngân theo TCVN 5152 : 1990.
- 5.8. Xác định hàm lượng cadimi theo AOAC 945.58.
- 5.9. Xác định hàm lượng thiếc theo TCVN 1981-88.
- 5.10. Xác định cloramphenicol theo ISO 13493 : 1998.
- 5.11. Xác định họ tetracyclin theo AOAC 995.09.
- 5.12. Xác định hoocmon (diethylstilbestrol) theo AOAC 956.10.

6. Ghi nhãn, bao gói, vận chuyển và bảo quản**6.1. Ghi nhãn**

Theo “ Qui chế ghi nhãn hàng hoá lưu thông trong nước và hàng hoá xuất khẩu, nhập khẩu” ban hành kèm theo Quyết định số 178/1999/QĐ - TTg.

6.2. Bao gói

Thịt hộp được đựng trong các hộp kín, chuyên dùng cho thực phẩm.

Hộp chứa thịt không được biến dạng, không có vết răng cưa ở mối ghép, không bị phồng. Nhãn hiệu phải gắn chặt với bao bì. Các ký hiệu trên bao bì phải rõ ràng.

6.3. Vận chuyển

Phương tiện vận chuyển thịt hộp phải khô, sạch.

6.4. Bảo quản

Đồ hộp thịt được bảo quản ở nơi khô, sạch, thoáng mát, có mái che và tránh ánh nắng mặt trời. Thời gian bảo quản theo công bố của nhà sản xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Quyết định số 867/1998/QĐ-BYT về “ Danh mục tiêu chuẩn vệ sinh đối với lương thực, thực phẩm”.

THỊT CHẾ BIẾN CÓ XỬ LÝ NHIỆT

Qui định kỹ thuật

Heat - Treated processed meat - Specification

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng cho các sản phẩm thịt gia súc, gia cầm và thịt chim, thú nuôi đã chế biến có xử lý nhiệt được dùng trực tiếp làm thực phẩm.

Tiêu chuẩn này không áp dụng đối với thịt hộp.

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

Quyết định số 3742/ 2001/QĐ-BYT: "Qui định danh mục các chất phụ gia được phép sử dụng trong thực phẩm".

Quyết định số 178/1999/QĐ - TTg: "Qui chế ghi nhãn hàng hoá lưu thông trong nước và hàng hoá xuất khẩu, nhập khẩu".

TCVN 3699 : 1990 Thuỷ sản. Phương pháp thử định tính hydro sulphua và amoniac.

TCVN 4834 : 1989 (ST SEV 3016 : 1981) Thịt. Phương pháp và nguyên tắc đánh giá vệ sinh thú y.

TCVN 4882 : 2001 (ISO 4831 : 1993). Vi sinh vật học. Hướng dẫn chung về định lượng Coliform. Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất.

TCVN 4991 : 1989 (ISO 7937 : 1985) Vi sinh vật học. Hướng dẫn chung đếm Clostridium perfringens. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc.

TCVN 4992 : 1989 (ISO 7932 : 1987) Vi sinh vật học. Hướng dẫn chung đếm Bacillus cereus. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C.

TCVN 5151 : 1990 Thịt và sản phẩm của thịt. Phương pháp xác định hàm lượng chì.

TCVN 5152 : 1990 Thịt và sản phẩm của thịt. Phương pháp xác định hàm lượng thuỷ ngân

TCVN 5153 : 1990 (ISO 6888 : 1993) Thịt và sản phẩm của thịt. Phương pháp phát hiện Salmonella.

TCVN 5155 : 1990 Thịt và sản phẩm của thịt. Phương pháp phát hiện và đếm số Escherichia coli.

TCVN 5156 : 1990 Thịt và sản phẩm của thịt. Phương pháp phát hiện và đếm số Staphylococcus aureus.

TCVN 5667 : 1992 Thịt và sản phẩm thịt. Phương pháp xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí.

TCVN 7046 : 2002 Thịt tươi - Quy định kỹ thuật.

TCVN 7047 : 2002 Thịt lạnh đông - Quy định kỹ thuật.

ISO 3091 : 1975 Meat and meat products - Determination of nitrite content (Reference method) [Thịt và sản phẩm thịt - Xác định hàm lượng nitrit (phương pháp chuẩn)]

ISO 13493 : 1998 Meat and meat products - Detection of chloramphenicol content - Method using liquid chromatography (thịt và sản phẩm thịt - Phát hiện hàm lượng cloramphenicol - Phương pháp sử dụng sắc ký lỏng).

AOAC 945.58 Cadmium in food - Dithizone method (Cadimi trong thực phẩm - Phương pháp dithizon)

AOAC 956.10 Diethylstilbestrol in feeds - Spectrophotometric method (Diethylstilbestrol trong thức ăn gia súc - Phương pháp quang phổ)

AOAC 995.09 Chlortetracycline, Oxytetracycline, and tetracycline in Edible Animal Tissues- Liquid chromatographic method (Clotetraxyclin, oxytetraxyclin, và tetraxyclin trong thức ăn gia súc - Phương pháp sắc ký lỏng).

AOAC 977.26 Clostridium botulinum and Its toxin in foods - Microbiological method (Clostridium botulinum và độc tố của chúng trong thực phẩm - Phương pháp vi sinh vật học).

3. Định nghĩa

3.1. **Sản phẩm thịt chế biến có xử lý nhiệt (heat - treated processed meat).** Sản phẩm chế biến từ thịt gia súc, gia cầm và thịt chim, thú nuôi mà quy trình công nghệ có qua công đoạn xử lý nhiệt sao cho nhiệt độ tâm sản phẩm trên 70°C và không nhất thiết phải gia nhiệt trước khi ăn.

4. Yêu cầu kỹ thuật

4.1. Nguyên liệu

- Thịt tươi, theo TCVN 7046 : 2002 và/hoặc
- Thịt lạnh đông, theo TCVN 7047 : 2002.

4.2. Yêu cầu về cảm quan

Yêu cầu về cảm quan của thịt chế biến có xử lý nhiệt được quy định trong bảng 1.

Bảng 1 - Yêu cầu về cảm quan đối với thịt chế biến có xử lý nhiệt

Tên chỉ tiêu	Yêu cầu
1. Màu sắc	Đặc trưng của sản phẩm
2. Mùi vị	Đặc trưng của sản phẩm, không có mùi, vị lạ
3. Trạng thái	Đặc trưng của sản phẩm

4.3. Các chỉ tiêu lý hóa

Các chỉ tiêu lý hóa của thịt chế biến có xử lý nhiệt được quy định trong bảng 2.

Bảng 2 - Các chỉ tiêu lý hóa của thịt chế biến có xử lý nhiệt

Tên chỉ tiêu	Yêu cầu
1. Phản ứng Kreiss	Âm tính
2. Phản ứng định tính dihydro sulphua (H ₂ S)	
3. Hàm lượng amoniác, mg/100 g, không lớn hơn	40,0
4. Hàm lượng nitrit, mg/100 g, không lớn hơn	167
5. Chỉ số peroxyt, số millilit natri thia sulphua (Na ₂ S ₂ O ₃) 0,002 N dùng để trung hòa hết lượng peroxyt trong 1 kg, không lớn hơn	5

4.4. *Dư lượng kim loại nặng*

Dư lượng kim loại nặng của thịt chế biến có xử lý nhiệt được quy định trong bảng 3.

Bảng 3 - Dư lượng kim loại nặng của thịt chế biến có xử lý nhiệt

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa (mg/kg)
1. Chì (Pb)	0,5
2. Cadimi (Cd)	0,05
3. Thủy ngân (Hg)	0,03

4.5. *Các chỉ tiêu vi sinh vật*

Các chỉ tiêu vi sinh vật của thịt chế biến có xử lý nhiệt được quy định trong bảng 4.

Bảng 4 - Các chỉ tiêu vi sinh vật của thịt chế biến có xử lý nhiệt

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa
1. Tổng số vi sinh vật hiếu khí, số khuẩn lạc trong 1 g sản phẩm	$3 \cdot 10^5$
2. <i>E. coli</i> , số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	3
3. Coliforms, số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	50
4. <i>Salmonella</i> , số vi khuẩn trong 25 g sản phẩm	0
5. <i>B. cereus</i> , số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	10
6. <i>Staphylococcus aureus</i> , số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	10
7. <i>Clostridium botulinum</i> , số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	0
8. <i>Clostridium perfringens</i> số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	0

4.6. *Dư lượng thuốc thú y*

Dư lượng thuốc thú y của thịt chế biến có xử lý nhiệt được quy định trong bảng 5.

Bảng 5 - Dư lượng thuốc thú y của thịt chế biến có xử lý nhiệt

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa (mg/kg)
1. Họ tetracyclin	0,1
2. Họ cloramphenicol	Không phát hiện

4.7. *Độc tố nấm mốc*

Hàm lượng aflatoxin B₁ của thịt chế biến có xử lý nhiệt không lớn hơn 0,005 mg/kg.

4.8. *Dư lượng hoocmon*

Dư lượng hoocmon của thịt chế biến có xử lý nhiệt được quy định trong bảng 6.

Bảng 6 - Dư lượng hoocmon của thịt chế biến có xử lý nhiệt

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa (mg/kg)
1. Diethyl stybestrol	0,0
2. Testosterol	0,015
3. Estadiol	0,0005

4.9. Phụ gia thực phẩm

Phụ gia thực phẩm: Theo “Qui định danh mục các chất phụ gia được phép sử dụng trong thực phẩm” ban hành kèm theo Quyết định số 3742/2001/QĐ-BYT.

5. Phương pháp thử

- 5.1. Thử định tính *dihydro sulphua* (H_2S) theo TCVN 3699 : 1990.
- 5.2. Xác định hàm lượng *nitrit* theo ISO 3091:1975.
- 5.3. Xác định hàm lượng *amoniac* (NH_3) theo TCVN 4834:1989 (ST SEV 3016 : 1981).
- 5.4. Xác định *Coliforms* theo TCVN 4882: 2001 (ISO 4831: 1993).
- 5.5. Xác định *Clostridium perfringens* theo TCVN 4991 : 1989 (ISO 7937 : 1985).
- 5.6. Xác định *Bacillus cereus* theo TCVN 4992 : 1989.
- 5.7. Xác định *Salmonella* theo TCVN 5153 : 1990 (ISO 6888 : 1993).
- 5.8. Xác định *E.coli* theo TCVN 5155: 1990.
- 5.9. Xác định *S.aureus* theo TCVN 5156 : 1990.
- 5.10. Xác định *Clostridium botulinum* theo AOAC 977.26.
- 5.11. Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí theo TCVN 5667 : 1992.
- 5.12. Xác định *Cloramphenicol* theo ISO 13493 : 1998.
- 5.13. Xác định họ *tetracyclin* theo AOAC 995.09.
- 5.14. Xác định *hoocmon (diethylstylbestrol)* theo AOAC 956.10.
- 5.15. Xác định hàm lượng chì theo TCVN 5151: 1990
- 5.16. Xác định hàm lượng cadimi theo AOAC 945.58.
- 5.17. Xác định hàm lượng thủy ngân theo TCVN 5152 : 1990

6. Ghi nhãn, bao gói, vận chuyển và bảo quản**6.1. Ghi nhãn**

Theo “Qui chế ghi nhãn hàng hoá lưu thông trong nước và hàng hoá xuất khẩu, nhập khẩu” ban hành kèm theo Quyết định số 178/1999/QĐ - TTg.

6.2. Bao gói

Sản phẩm thịt chế biến có xử lý nhiệt được đựng trong bao bì chuyên dùng cho thực phẩm, không ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm.

6.3. Vận chuyển

Phương tiện vận chuyển sản phẩm phải khô, sạch, không vận chuyển chung với các sản phẩm khác.

6.4. Bảo quản

Sản phẩm được bảo quản ở nơi khô, sạch, đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm. Thời hạn sử dụng theo công bố của nhà sản xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Quyết định số 867/1998/QĐ-BYT về “Danh mục tiêu chuẩn vệ sinh đối với lương thực, thực phẩm”.

THỊT CHẾ BIẾN KHÔNG QUA XỬ LÝ NHIỆT

Qui định kỹ thuật

Non - heat treated processed meat - Specification

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng cho các sản phẩm thịt gia súc, gia cầm và thịt chim, thú nuôi đã chế biến không qua xử lý nhiệt được dùng trực tiếp làm thực phẩm

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

Quyết định số 3742/2001/QĐ - BYT: "Qui định danh mục các chất phụ gia được phép sử dụng trong thực phẩm".

Quyết định số 178/1999/QĐ - TTg: "Qui chế ghi nhãn hàng hoá lưu thông trong nước và hàng hóa xuất khẩu, nhập khẩu".

TCVN 3699: 1 990 Thủy sản. Phương pháp thử định tính hydro sulphua và amoniac.

TCVN 4834 : 1989 (ST SEV 3016 : 1981) Thịt. Phương pháp và nguyên tắc đánh giá vệ sinh thú y.

TCVN 4882 : 2001 (ISO 4831 : 1993) Vi sinh vật học. Hướng dẫn chung về định lượng Coliform. Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất.

TCVN 4835 : 2002 (ISO 2917: 1999) Thịt và các sản phẩm thịt - Đo độ pH - Phương pháp chuẩn

TCVN 4991 : 1989 (ISO 7937 : 1985 Vi sinh vật học. Hướng dẫn chung đếm Clostridium perfringens. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc.

TCVN 4992: 1989 (ISO 7932: 1987) Vi sinh vật học. Hướng dẫn chung đếm Bacillus cereus. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C.

TCVN 5151: 1990 Thịt và sản phẩm của thịt. Phương pháp xác định hàm lượng chì.

TCVN 5152: 1990 Thịt và sản phẩm thịt. Phương pháp xác định hàm lượng thủy ngân.

TCVN 5153: 1990 (ISO 6888: 1993) Thịt và sản phẩm thịt. Phương pháp phát hiện Salmonella.

TCVN 5155 : 1990 Thịt và sản phẩm của thịt. Phương pháp phát hiện và đếm số Eschenchia coli.

TCVN 5156 : 1990 Thịt và sản phẩm của thịt. Phương pháp phát hiện và đếm số Staphylococcus aureus.

TCVN 5667: 1992 Thịt và sản phẩm thịt. Phương pháp xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí.

TCVN 5733 : 1993 Thịt. Phương pháp phát hiện ký sinh trùng.

TCVN 7046 : 2002 Thịt tươi - Qui định kỹ thuật.

TCVN 7047 : 2002 Thịt lạnh đông - Qui định kỹ thuật.

ISO 3091 : 1975 Meat and meat products - Determination of nitrite content (Reference method)
[Thịt và sản phẩm thịt - Xác định hàm lượng nitrit (phương pháp chuẩn)]

ISO 13493:1998 Meat and meat products - Detection of chloramphenicol content - Method using liquid chromatography (thịt và sản phẩm thịt - Phát hiện hàm lượng cloramphenicol - Phương pháp sử dụng sắc ký lỏng).

AOAC 945.58 Cadmium in food - Dithizone method (Cadimi trong thực phẩm - Phương pháp dithizon)

AOAC 956.10 Diethylstilbestrol in feeds - Spectrophotometric method (Diethylstilbestrol trong thức ăn gia súc - Phương pháp quang phổ)

AOAC 995.09 Chlotetracycline, Oxytetracycline, and tetracycline in Edible Animal Tissues - Liquid chromatographic method (Clotetraxyclin, oxytetraxyclin, và tetraxyclin trong thức ăn gia súc - Phương pháp sắc ký lỏng).

AOAC 977.26 Clostridium botulinum and its toxin in foods - Microbiological method (Clostridium botulinum và độc tố của chúng trong thực phẩm - Phương pháp vi sinh vật học).

3. Định nghĩa

3.1. **Sản phẩm thịt chế biến không qua xử lý nhiệt (non- heat treated processed meat):** Sản phẩm chế biến từ thịt gia súc, gia cầm và thịt chim, thú nuôi mà quy trình công nghệ không qua công đoạn xử lý nhiệt sao cho nhiệt độ tâm sản phẩm nhỏ hơn 70°C và không nhất thiết phải gia nhiệt trước khi ăn.

4. Yêu cầu kỹ thuật

4.1. Nguyên liệu

- Thịt tươi, theo TCVN 7046: 2002 và/hoặc
- Thịt lạnh đông, theo TCVN 7047: 2002.

4.2. Yêu cầu về cảm quan

Yêu cầu về cảm quan của chế biến thịt không qua xử lý nhiệt được quy định trong bảng 1.

Bảng 1 - Yêu cầu về cảm quan của thịt chế biến không qua xử lý nhiệt

Tên chỉ tiêu	Yêu cầu
1. Màu sắc	Đặc trưng của sản phẩm
2. Mùi vị	Đặc trưng của sản phẩm, không có mùi, vị lạ
3. Trạng thái	Đặc trưng của sản phẩm

4.3. Các chỉ tiêu lý hóa

Các chỉ tiêu lý hóa của thịt chế biến không qua xử lý nhiệt được quy định trong bảng 2

Bảng 2 - Các chỉ tiêu lý hóa của thịt chế biến không qua xử lý nhiệt

Tên chỉ tiêu	Yêu cầu
1. Độ pH	4,5 - 5,5
2. Phản ứng Kreiss	âm tính
3. Phản ứng định tính dihydro sulphua (H ₂ S)	
4. Hàm lượng amoniac, mg/100 g, không lớn hơn	40,0
5. Hàm lượng nitrit mg/100, không lớn hơn	134

4.4. Dư lượng kim loại nặng

Dư lượng kim loại nặng của thịt chế biến không qua xử lý nhiệt được quy định trong bảng 3.

Bảng 3 - Dư lượng kim loại nặng của thịt chế biến không qua xử lý nhiệt

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa (mg/kg)
1. Chì (Pb)	0,5
2. Cadimi (Cd)	0,05
3. Thủy ngân (Hg)	0,03

4.5. Các chỉ tiêu vi sinh vật

Các chỉ tiêu về vi sinh vật của thịt chế biến không qua xử lý nhiệt được quy định trong bảng 4

Bảng 4 - Các chỉ tiêu về vi sinh vật của thịt chế biến không qua xử lý nhiệt.

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa
1. Tổng số vi sinh vật hiếu khí, số khuẩn lạc trong 1 g sản phẩm	3. 10 ⁵
2. <i>E coli</i> , số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	3
3. <i>Coliforms</i> , số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	50
4. <i>Salmonella</i> , số vi khuẩn trong 25g sản phẩm	0
5. <i>B. cereus</i> , số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	10
6. <i>Staphylococcus aureus</i> , số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	10
8. <i>Clostridium botulinum</i> số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	10
7. <i>Clostridium perfringens</i> , số vi khuẩn trong 1 g sản phẩm	0

4.6. Các chỉ tiêu ký sinh trùng

Các chỉ tiêu ký sinh trùng của thịt chế biến không qua xử lý nhiệt được quy định trong bảng 5.

Bảng 5 - Các chỉ tiêu ký sinh trùng của thịt chế biến không qua xử lý nhiệt

Tên chỉ tiêu	Giới hạn cho phép
1. Gao bò, gao lợn (<i>Cysticercus csuitsae</i> ; <i>Cysticercus bovis</i>)	Không cho phép
2. Giun xoắn (<i>Trichinalla spiralis</i>)	

4.7. *Dư lượng thuốc thú y*

Dư lượng thuốc thú y của thịt chế biến không qua xử lý nhiệt được quy định trong bảng 6

Bảng 6 - Dư lượng thuốc thú y của thịt chế biến không qua xử lý nhiệt

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa (mg/kg)
1. Họ tetracyclin	0,1
2. Họ cloramphenicol	không phát hiện

4.8. *Độc tố nấm mốc*

Hàm lượng aflatoxin B₁ của thịt chế biến không qua xử lý nhiệt không lớn hơn 0,005 mg/kg

4.9. *Dư lượng hoocmon*

Dư lượng hoocmon của thịt chế biến không qua xử lý nhiệt quy định trong bảng 7

Bảng 7 - Dư lượng hoocmon của thịt chế biến không qua xử lý nhiệt

Tên chỉ tiêu	Giới hạn tối đa (mg/kg)
1. Diethylstilbestron	0,0
2. Testoterol	0,015
3. Stadiol	0,0005

4.10. *Phụ gia thực phẩm*

Phụ gia thực phẩm: Theo "Qui định danh mục các chất phụ gia được phép sử dụng trong thực phẩm" ban hành kèm theo Quyết định số 3742/2001/QĐ-BYT

5. *Phương pháp thử*

- 5.1. Thử định tính *dihydro sulphua* (H₂S) theo TCVN 3699: 1990
- 5.2. Xác định hàm lượng *amoniac* (NH₃) theo TCVN 4834:1989 (ST SEV 3016 : 1981)
- 5.3. Xác định pH theo TCVN 4835: 2002 (ISO 2917: 1999)
- 5.4. Xác định hàm lượng *nitrit* theo ISO 3091 : 1975.
- 5.5. Xác định *Coliforms* theo TCVN 4882 : 2001 (ISO 4831 : 1 993).
- 5.6. Xác định *Clostridium perfringens* theo TCVN 4991 : 1989 (ISO 7937 : 1985).
- 5.7. Xác định *Clostridium botulinum* AOAC 977.26
- 5.8. Xác định *Bacillus cereus* theo TCVN 4992 : 1989.
- 5.9. Xác định *Salmonella* theo TCVN 5153: 1990 (ISO 6888: 1993).

- 5.10. Xác định *E. coli* theo TCVN 5155 : 1990
- 5.11. Xác định *S.aureus* theo TCVN 5156: 1990
- 5.12. Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí theo TCVN 5667 : 1992.
- 5.13. Xác định hàm lượng chì theo TCVN 5151: 1990.
- 5.14. Xác định hàm lượng cadimi theo AOAC 945.58
- 5.15. Xác định hàm lượng thủy ngân theo TCVN 5152:1990
- 5.16. Phát hiện ký sinh trùng theo TCVN 5733 : 1993.
- 5.17. Xác định cloramphenicol theo ISO 13493 : 1998.
- 5.18. Xác định họ tetracyclin theo AOAC 995.09.
- 5.19. Xác định hoocmon (diethylstilbestron) theo AOAC 956.10.

6. Ghi nhãn, bao gói, vận chuyển và bảo quản

6.1. Ghi nhãn

Theo "Qui chế ghi nhãn hàng hoá lưu thông trong nước và hàng hoá xuất khẩu, nhập khẩu" ban hành kèm theo Quyết định số 178/1999/QĐ-TTg.

6.2. Bao gói

Sản phẩm thịt chế biến không qua xử lý nhiệt được đựng trong bao bì chuyên dùng cho thực phẩm, không ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm.

6.3. Vận chuyển

Phương tiện vận chuyển sản phẩm phải khô, sạch, không vận chuyển chung với các sản phẩm khác.

6.4. Bảo quản

Sản phẩm được bảo quản ở nơi khô, sạch, thoáng mát. Thời hạn sử dụng theo công bố của nhà sản xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Quyết định 867/QĐ-BYT của Bộ Y tế về "Danh mục tiêu chuẩn vệ sinh đối với lương thực, thực phẩm".

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT

Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử

Phần 1: Lấy mẫu

Meat and meat products - Sampling and preparation of test samples
Part 1: Sampling

- TCVN 4833 - 1 +2: 2002 thay thế TCVN 4833 : 1993;
- TCVN 4833 - 1: 2002 hoàn toàn tương đương với ISO 3100 - 1: 1991;

1. Phạm vi áp dụng

- 1.1. Tiêu chuẩn này đưa ra các hướng dẫn chung và qui định quy trình lấy mẫu ban đầu của thịt và sản phẩm thịt.
- 1.2. Điểm khác nhau giữa các qui trình lấy mẫu đối với các loại sản phẩm như sau:
 - a) Chuyển hàng hoặc các lô thịt, hoặc các sản phẩm thịt được chế biến, hoặc được đóng thành các đơn vị riêng lẻ với các loại cỡ (thí dụ xúc xích, thịt xay được đóng bao bằng chân không, xúc xích thái mỏng, dăm bông đóng hộp) hoặc thịt miếng có khối lượng không quá 2 kg.
 - b) Thân thịt, thịt miếng hoặc thịt muối có khối lượng trên 2 kg (thí dụ thân thịt muối xông khói, sườn thịt lợn muối xông khói, thịt tươi và thịt đông lạnh có xương và không xương, sườn hoặc thân thịt bò sườn thịt lợn, thân thịt của cừu non, thịt hươu), và thịt được tách bằng phương pháp cơ học hoặc thịt khô.
- 1.3. Cỡ và giá trị thương mại của các sản phẩm thịt như trên có thể cần phải lấy mẫu thứ cấp, chỉ sử dụng một phần của mẫu ban đầu, để đạt mục đích của việc lấy mẫu.
- 1.4. Nhìn chung qui trình lấy mẫu này là dùng cho mục đích thương mại. Trong các trường hợp đặc biệt, thí dụ như để giám sát thực phẩm, thì có thể cần phải theo các qui trình khác.

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

ISO 7002: 1986, Agricultural food products - Layout for a standard method of sampling from a lot (Nông sản thực phẩm - Trình bày phương pháp chuẩn để lấy mẫu từ lô hàng).

3. Định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa nêu trong ISO 7002.

4. Thủ tục

4.1. Người lấy mẫu

Việc lấy mẫu phải do người lấy mẫu được các bên có liên quan uỷ quyền và đã được đào tạo đúng theo kỹ thuật thích hợp. Người đó phải làm việc độc lập và không chấp nhận sự can thiệp của bên thứ ba. Người lấy mẫu có thể được người khác giúp đỡ nhưng người lấy mẫu phải chịu trách nhiệm chính. Người lấy mẫu và người trợ giúp có các biện pháp thích hợp để tránh làm nhiễm bẩn cả chuyến hàng (hoặc lô hàng) và đơn vị mẫu (thí dụ, rửa tay trước khi xử lý vật liệu cần lấy mẫu).

4.2. Đại diện của bên có liên quan

Nếu có thể, đại diện của các bên có liên quan nên có mặt khi tiến hành lấy mẫu.

4.3. Biên bản lấy mẫu

Các mẫu phòng thử nghiệm phải kèm theo biên bản lấy mẫu đã ký tên của người lấy mẫu và đại diện của các bên có liên quan ký, nếu có mặt. Biên bản bao gồm các thông tin sau:

- a) Tên và địa chỉ của người lấy mẫu;
- b) Tên và địa chỉ các đại diện của các bên có liên quan;
- c) Địa điểm, ngày, điểm lấy mẫu và thời gian lấy mẫu;
- d) Bản chất và xuất xứ của chuyến hàng hoặc lô hàng;
- e) Lượng và số lượng đơn vị cấu thành chuyến hàng hoặc lô hàng;
- f) Dấu hiệu và số hiệu lô hàng;
- g) Dấu hiệu nhận biết tàu chở hàng, toa tàu hoả hoặc xe tải, nếu thích hợp;
- h) Nơi gửi hàng;
- i) Nơi nhận hàng;
- j) Ngày đến của chuyến hàng hoặc lô hàng;
- k) Tên và địa chỉ người bán;
- l) Tên và địa chỉ người mua;
- m) Số và ngày của vận đơn hoặc hợp đồng;
- n) Phương pháp lấy mẫu;
- o) Số lượng đơn vị mẫu đối với từng lô;
- p) Dấu hiệu niêm phong của các đơn mẫu;
- q) Số lượng và dấu hiệu của lô hàng mà từ đó lấy ra các đơn vị mẫu;
- r) Khối lượng của các đơn vị mẫu;
- s) Nơi đơn vị mẫu được gửi đến.

Báo cáo cũng phải bao gồm mọi chi tiết liên quan đến các điều kiện hoặc các tình huống có thể ảnh hưởng đến việc lấy mẫu, thí dụ tình trạng bao gói và điều kiện môi trường xung quanh chúng (nhiệt độ và độ ẩm không khí), nhiệt độ của sản phẩm và nhiệt độ của các đơn vị mẫu, các phương pháp khử trùng thiết bị và vật chứa mẫu, và mọi thông tin đặc biệt khác có liên quan đến vật liệu cần lấy mẫu.

5. Niêm phong và dán nhãn

Mẫu phòng thử nghiệm phải được niêm phong và dán nhãn. Dấu niêm phong phải được gắn, sao cho không thể lấy mẫu hoặc nhãn ra mà không phá huỷ dấu niêm phong.

Nhãn phải có chất lượng và cỡ thích hợp (thí dụ màu sáng, không thấm mỡ, bìa không thấm nước có lỗ xâu gia cố). Nhãn phải được đóng bằng dấu không tẩy xoá được và gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết các đơn vị mẫu, tối thiểu bao gồm những thông tin sau:

- a) Bản chất và xuất xứ của chuyển hàng hoặc lô hàng;
- b) Lượng và số lượng các đơn vị cấu thành chuyển hàng hoặc lô hàng;
- c) Địa điểm và ngày lấy mẫu;
- d) Tên người mua và người bán;
- e) Số lượng và dấu hiệu của lô hàng mà từ đó lấy ra các đơn vị mẫu;
- f) Nhiệt độ không khí bao quanh đơn vị mẫu tại thời điểm lấy mẫu.

6. Các phương pháp lấy mẫu

6.1. Dụng cụ lấy mẫu và các vật chứa đơn vị mẫu

6.1.1. Yêu cầu chung

Vật liệu của vật chứa tiếp xúc trực tiếp với các đơn vị mẫu phải không thấm nước, không thấm mỡ, không hoà tan và không hấp thụ.

Các vật chứa phải có dung tích và hình dạng phù hợp với cỡ của các đơn vị mẫu cần lấy. Các vật chứa phải được đóng kín, trường hợp chai, lọ thì được đóng kín bằng nút cao su hoặc nút bằng chất dẻo hoặc được đậy bằng nút bần mới, hoặc được đậy bằng nắp vận bằng kim loại hoặc chất dẻo. Các nút đậy phải bọc bằng lớp vật liệu trơ trước khi đậy vào vật chứa mẫu. Nắp vận phải có lớp lót kín làm bằng vật liệu trơ.

Các vật liệu và dụng cụ không được ảnh hưởng đến kết quả kiểm tra, đặc biệt, phải đáp ứng được các yêu cầu qui định trong 6.1.2 đến 6.1.4. Có thể cần giảm thiểu ảnh hưởng của ánh sáng và / hoặc oxi.

6.1.2. Dụng cụ vật chứa các đơn vị mẫu để phân tích hoá học

Dụng cụ lấy mẫu và các vật chứa đơn vị mẫu phải khô, sạch và không ảnh hưởng đến thành phần hoá học của sản phẩm.

6.1.3. Dụng cụ và các vật chứa đơn vị mẫu để kiểm tra cảm quan

Dụng cụ lấy mẫu và các vật chứa đơn vị mẫu phải khô, sạch và không thôi mùi hoặc vị đến sản phẩm.

6.1.4. Dụng cụ và vật chứa các đơn vị mẫu để kiểm tra vi sinh vật và các mục đích khác (thí dụ sinh vật học, huyết thanh học, mô học, hoặc kiểm tra ký sinh trùng độc tố và dùng để thử nuôi cấy)

Dụng cụ lấy mẫu và vật chứa đơn vị mẫu phải sạch, vô trùng và không ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật của sản phẩm.

Nếu cần, khử trùng dụng cụ lấy mẫu và các vật chứa mẫu theo một trong số các phương pháp sau:

- a) Khử trùng ướt ở nhiệt độ không thấp hơn 121°C, trong thời gian không ít hơn 20 phút;
- b) Khử trùng khô ở nhiệt độ không thấp hơn 170°C, trong thời gian không ít hơn 1 h, dùng tủ sấy có khả năng điều hoà không khí để đảm bảo duy trì được nhiệt độ đồng đều ở tất cả các vị trí trong tủ sấy.

Nếu cả hai phương pháp a) hoặc phương pháp b) đều không dùng được và nếu dụng cụ được sử dụng ngay sau khi khử trùng, thì có thể sử dụng một trong số các phương pháp sau:

- c) Cho tiếp xúc với hơi nước ở nhiệt độ 100°C trong vòng 1 h;

- d) Ngâm trong etanol 96 % (V/V) và cho cháy hết etanol;
- e) Đốt bằng ngọn lửa hydrocarbon (thí dụ propan hoặc butan) sao cho tất cả bề mặt làm việc tiếp xúc với ngọn lửa.

6.2. Số lượng đơn vị mẫu cần lấy

Số lượng các đơn vị mẫu cần lấy để thu được mẫu ban đầu có thể đại diện cho chuyển hàng hoặc lô hàng phải phù hợp với phương án lấy mẫu qui định trong hợp đồng hoặc theo thoả thuận giữa các bên có liên quan.

Nếu phải tiến hành các loại phép thử khác nhau (thí dụ hoá chất, vi sinh vật, vật lý và cảm quan) thì phải lấy các đơn vị mẫu riêng biệt cho từng loại phép thử.

6.3. Quy trình lấy mẫu

- 6.3.1. Đối với thịt hoặc sản phẩm thịt được chế biến hoặc đóng gói thành những đơn vị riêng lẻ với các cỡ, hoặc thịt miếng có khối lượng không quá 2 kg [xem 1.2 a)]

Lấy các đơn vị hoặc miếng thịt nguyên như đơn vị mẫu ban đầu. Lấy số lượng các đơn vị mẫu ban đầu theo qui định mỗi lô theo phương án lấy mẫu được đề cập trong 6.2.

- 6.3.2. Đối với thân thịt, thịt miếng hoặc thịt muối có khối lượng trên 2 kg, và thịt được tách bằng phương pháp cơ học hoặc thịt khô [xem 1.2 b)].

Lấy số lượng các đơn vị mẫu ban đầu theo yêu cầu đối với từng lô hàng theo phương án lấy mẫu được đề cập trong 6.2 và để riêng chúng để lấy các đơn vị mẫu thứ cấp dùng để kiểm tra phá huỷ trong phòng thử nghiệm (thí dụ kiểm tra hoá chất hoặc kiểm tra vi sinh vật) hoặc để kiểm tra không phá huỷ (thí dụ kiểm tra bằng mắt, đánh giá cảm quan, kiểm tra vi sinh vật bằng kỹ thuật Swab).

Một mẫu đơn được lấy từ thân thịt hoặc từ các miếng thịt lớn không thể đại diện thực sự cho toàn bộ thân thịt hoặc miếng thịt đó, nhưng thực tế không thể phân tích toàn bộ khối thịt. Do đó, khi lấy mẫu ban đầu hay lấy mẫu thứ cấp, mục đích của việc lấy mẫu sẽ quyết định qui trình lấy mẫu phải tuân theo.

Như vậy, nói chung các mẫu phải được lấy như sau:

- a) Đơn vị mẫu bề mặt (thí dụ để phát hiện coliform hoặc Salmonella) phải được lấy bằng cách dùng các tấm bông lớn, ẩm và thấm trên toàn bộ đơn vị thịt (hoặc các diện tích được chọn) hoặc (tính số vi sinh vật được đánh dấu) bằng cách xác định diện tích sử dụng kỹ thuật đường và cắt, hoặc trong trường hợp thịt đông lạnh thì cạo diện tích này.
- b) Lấy các đơn vị mẫu thứ cấp được cắt thành miếng từ bề mặt cắt sao cho việc tổn thương mẫu là nhỏ nhất, với khối lượng khoảng 500 g đến 1 kg để kiểm tra hoá học hoặc vi sinh vật ở trong phòng thử nghiệm.
- c) Lấy đơn vị mẫu thịt ở bắp sâu để kiểm tra vi sinh vật [thí dụ để xác định sự thối rữa sâu ở xương (“thối xương”) từ phần nhiễm bệnh của thân thịt bằng dụng cụ chuyên dùng bằng thép không gỉ vô trùng, hoặc dùng khoan và dao nhỏ đối với thịt đông lạnh.
- d) Lấy các đơn vị mẫu mỡ (thí dụ để kiểm tra một số hợp chất hoà tan trong mỡ như dư lượng thuốc bảo thực vật) có thể lấy từ mỡ quả thận.
- e) Lấy các đơn vị mẫu nước tiết dịch của thịt, thí dụ thịt ướp lạnh trong bao bì chân không, phải lấy một cách vô trùng qua lớp bao bì hoặc sau khi mở bao bì bằng xi lanh và / hoặc bình hoặc lọ vô trùng. Nếu thịt trả về lô hàng thì phải làm sau khi bao gói lại trong bao bì chân không.

6.3.3. Nhiệt độ

Trên thực tế có thể ghi lại nhiệt độ của từng lô hàng được lấy mẫu.

6.4. Bao gói đơn vị mẫu

- 6.4.1. Thịt hoặc sản phẩm thịt đã được chế biến hoặc được đóng thành các đơn vị riêng lẻ với các cỡ, hoặc thịt miếng có khối lượng không quá 2 kg [xem 1.2 a)].

Nếu các đơn vị được bao gói trong các vật chứa kín, thì không yêu cầu bao gói tiếp. Nếu các đơn vị chưa được đóng gói, thì gói từng đơn vị mẫu vào trong vật chứa mẫu thích hợp, đóng kín, niêm phong và dán nhãn (xem điều 5 và 6.1).

- 6.4.2. Thân thịt, thịt miếng hoặc thịt muối có khối lượng trên 2 kg và thịt được tách bằng phương pháp cơ học hoặc thịt khô [xem 1.2 b)]

Gói từng đơn vị mẫu trong túi chất dẻo thích hợp, đóng kín, niêm phong và dán nhãn (xem điều 5 và 6.1).

Các tấm bông để kiểm tra vi sinh vật được đựng trong các vật chứa vô trùng và mẫu nước tiết dịch của thịt được đựng trong các bình hoặc lọ vô trùng.

Chú thích 1 - Nếu có thể, gói các đơn vị mẫu khác nhau trong cùng một hoặc nhiều vật chứa, việc niêm phong và dán nhãn cho từng đơn vị mẫu là không cần thiết khi các vật chứa này được niêm phong và dán nhãn theo điều 5 và 6.1.

6.5. Vận chuyển và bảo quản các đơn vị mẫu

Sau khi lấy mẫu, gửi các đơn vị mẫu đến phòng thử nghiệm càng nhanh càng tốt, trong suốt thời gian đó chúng phải được duy trì ở nhiệt độ bảo quản sản phẩm. Tuy nhiên, trường hợp các sản phẩm mà đã làm lạnh, thì vận chuyển các đơn vị mẫu:

- Ở nhiệt độ từ 0°C đến 2°C nếu dự tính sẽ kiểm tra trong 24 h, hoặc;
- Trường hợp mẫu còn lại làm đông lạnh ở nhiệt độ không quá -24°C; tuy nhiên, các mẫu không dùng để kiểm tra vật lý hoặc cảm quan thì thường không phải làm đông lạnh.

Chú ý tránh phơi các đơn vị mẫu trực tiếp dưới ánh mặt trời trong suốt quá trình vận chuyển. Các đơn vị mẫu chuyển đến phòng thử nghiệm phải ở tình trạng không bị hư hỏng và còn nguyên niêm phong.

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT

Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử

Phần 2: Chuẩn bị mẫu thử để kiểm tra vi sinh vật

Meat and meat products - Sampling and preparation of test samples

Part 2: Preparation of test samples for microbiological examination

TCVN 4833 - 1 + 2: 2002 thay thế TCVN 4833: 1993;

TCVN 4833 - 2: 2002 hoàn toàn tương đương với ISO 3100 - 2: 1988;

1. Phạm vi áp dụng

- 1.1. Tiêu chuẩn này đưa ra các hướng dẫn chung và quy định quy trình dưới đây để kiểm tra vi sinh vật của thịt và sản phẩm thịt, sau khi lấy mẫu phòng thử nghiệm.
- 1.2. Điểm khác nhau giữa qui trình lấy mẫu đối với các sản phẩm được phân thành các loại sau:
 - a) Chuyển hàng hoặc các lô thịt, hoặc các sản phẩm thịt được chế biến, hoặc được đóng thành các đơn vị riêng lẻ với các loại cỡ (thí dụ xúc xích, thịt xay được đóng bao bằng chân không, xúc xích thái mỏng, dăm bông đóng hộp) hoặc thịt muối có khối lượng không quá 2kg.
 - b) Thân thịt, thịt miếng, hoặc thịt muối có khối lượng trên 2 kg, và thịt đã được tách bằng phương pháp cơ học hoặc làm thịt khô

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218 : 1996), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc - Nguyên tắc chung).

TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887 : 1993), Vi sinh vật học - Hướng dẫn chung về chuẩn bị các dụng dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 4833 - 1 : 2002 (ISO 3100 - 1), Thịt và sản phẩm thịt - Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử - Phần 1 : Lấy mẫu.

3. Nguyên tắc

Chuẩn bị các mẫu thử để kiểm tra vi sinh vật. Điều này yêu cầu cần phải làm rõ đông và/hoặc nghiền nhỏ các mẫu thịt "không bao gói" hoặc ủ trước, khử trùng mặt ngoài và sản phẩm đã chế biến hoặc sản phẩm được đóng trong các đơn vị bao gói kín được mở trong các điều kiện vô trùng.

4. Thủ tục

Kiểm tra báo cáo lấy mẫu và nhãn của các mẫu phòng thử nghiệm nhận được [xem TCVN 4833 - 1 : 2002 (ISO 3001 - 1)]. Ngày nhận và trạng thái của mẫu, kể cả nhiệt độ cũng phải ghi lại.

Phải nêu rõ mục đích là mẫu để kiểm tra vi sinh vật và các yêu cầu cụ thể.

5. Dịch pha loãng và thuốc thử

5.1. Các thành phần cơ bản

Để tăng độ tái lập của các kết quả, nên sử dụng các thành phần cơ bản khô để chuẩn bị các dịch pha loãng. Tương tự, cũng có thể sử dụng các thuốc thử có bán sẵn. Phải tuân thủ nghiêm ngặt các chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Hoá chất sử dụng phải là loại đạt chất lượng phân tích.

Nước sử dụng phải được cất hoặc loại ion, và không chứa các chất có thể gây ức chế sự phát triển của vi sinh vật dưới các điều kiện thử nghiệm.

Sử dụng pH met (6.10) đã được chỉnh đến nhiệt độ 25°C để đo độ pH.

Nếu các dịch pha loãng và thuốc thử chưa sử dụng ngay, thì giữ nơi tối ở nhiệt độ từ 0°C đến +5°C và trong các điều kiện không làm thay đổi thành phần, trừ khi có qui định khác. Dịch pha loãng và thuốc thử không giữ quá 1 tháng.

5.2. Dịch pha loãng dùng cho các tấm bông

Thành phần

Pepton	1,0g
Natri clorua	8,5g
Nước	1000ml

Chuẩn bị và phân phối dịch pha loãng

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là 7,0 ở 25°C. Phân phối vào ống hoặc bình các lượng thích hợp, sao cho sau khi khử trùng mỗi ống hoặc bình chứa 9,0 ml dịch pha loãng.

Đậy ống hoặc bình lại.

Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121°C ± 1°C trong 20 min

5.3. Dịch pha loãng dùng cho tấm alginat

Thành phần

Natri clorua	2,25g
Kali clorua	0,105g
Canxi clorua	0,12g
Natri hydrocacbonat (NaHCO ₃)	0,05g
Natri hexametaphosphat [chủ yếu là (NaPO ₃) ₆]	10g
Nước	1000ml

Chuẩn bị và phân phối dịch pha loãng

Hoà tan các thành phần trên trong nước, hoặc hoà tan các viên có bán sẵn của môi trường hoàn chỉnh khô trong 10 ml nước đựng trong ống hoặc bình. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là 7,0 ở 25°C, nếu cần.

Nếu không sử dụng các viên bán sẵn, thì phân phối các lượng vào các ống hoặc các bình đậy kín, sao cho sau khi khử trùng mỗi bình chứa 10 ml.

Khử trùng trong nồi hấp (6.1) ở 121°C ± 1°C trong 20 min.

5.4. *Etanol*, 95% đến 96% (V/V).

5.5. **Hỗn hợp chất khử trùng**

Thành phần

Etanol (5.4)	60ml
Axit hydrocloric ($\rho = 1,19\text{g/ml}$)	10ml
Nước	30ml

6. **Thiết bị và dụng cụ thủy tinh**

Chú thích - Có thể dùng dụng cụ sử dụng một lần để thay cho dụng cụ thủy tinh nếu có các qui định phù hợp.

Sử dụng thiết bị phòng thử nghiệm vi sinh vật và đặc biệt sau:

6.1. **Thiết bị để khử trùng khô (tủ sấy) hoặc khử trùng ướt (nồi hấp áp lực)**

Các dụng cụ tiếp xúc với dịch pha loãng hoặc mẫu phải được khử trùng, trừ khi các dụng cụ này được cung cấp dưới dạng vô trùng (đặc biệt dụng cụ làm bằng chất dẻo):

- Giữ trong tủ sấy (6.1) ở nhiệt độ từ 170°C đến 175°C, không ít hơn 1 h, hoặc
- Giữ trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121°C $\pm$ 1°C, không ít hơn 20 min

6.2. **Thiết bị trộn**

Sử dụng một trong số các thiết bị sau:

- a) Máy xay thịt, kích cỡ phòng thử nghiệm, có thể khử trùng, được gắn với đĩa có các lỗ với đường kính lỗ không quá 4 mm;
- b) Bộ trộn kiểu nhu động (túi trộn), có các túi làm bằng chất dẻo vô trùng

6.3. **Tủ ấm**, để duy trì các hộp ở nhiệt độ qui định để phát hiện những hộp khuyết tật và để rã đông nhanh các mẫu đông lạnh

6.4. **Tủ lạnh**, có khả năng duy trì ở nhiệt độ 2°C và tủ đá có thể duy trì ở nhiệt độ - 24°C hoặc thấp hơn, để bảo quản mẫu.

6.5. **Dụng cụ** (có thể vô trùng), để mở các túi thịt và thái mẫu, thí dụ vật mở hộp, kéo, dao và bộ kẹp

6.6. **Tăm bông**, bằng sợi bông hoặc alginat

6.7. **Ống hoặc bình**, có các viên thủy tinh, các tăm bông có thể lắc trong đó.

6.8. **Bình**, để chứa mẫu nước tiết dịch của thịt.

6.9. **Pipet hoặc xi lanh**, để loại bỏ nước tiết dịch của thịt đã rã đông hoặc từ các mẫu thịt bao gói sẵn.

6.10. **pH-met**, chính xác đến 0,1 đơn vị pH ở 25°C.

7. **Nhận mẫu và bảo quản**

7.1. **Khái quát**

Các mẫu phải được bảo quản ở nhiệt độ qui định, tránh ánh nắng trực tiếp hoặc các nguồn nóng khác.

Tránh nhiễm bẩn [xem thêm TCVN 4833 -1 : 2002 (ISO 3100-1)].

Kiểm tra càng nhanh càng tốt ngay sau khi nhận mẫu và trong mọi trường hợp, phải nằm trong giới hạn của 7.2 và 7.3.

7.2. Thịt và sản phẩm thịt được chế biến hoặc đóng thành các đơn vị riêng lẻ với một số cỡ, và thịt miếng không quá 2 kg

7.2.1. Thịt tươi.

Bảo quản mẫu trong tủ lạnh (6.4) sau khi nhận mẫu và kiểm tra mẫu trong vòng 24 h

Nếu phải bảo quản lâu hơn, thì làm đông lạnh mẫu trong tủ đá (6.4) càng nhanh càng tốt.

Đối với mẫu đông lạnh, thì nêu rõ tình trạng nhiệt độ và thời gian bảo quản lạnh trong báo cáo kết quả.

7.2.2. Thịt đông lạnh

Các mẫu đưa về phòng thử nghiệm trong điều kiện đông lạnh và ở nhiệt độ qui định, hoặc trong mọi trường hợp ở nhiệt độ - 24°C hoặc thấp hơn. Bảo quản mẫu ở trong tủ đá (6.4).

7.2.3. Các sản phẩm bảo quản tạm thời

Các mẫu phải được bảo quản trong tủ lạnh (6.4).

Các mẫu khuyết tật phải để trong vật chứa kín (thí dụ các túi bằng chất dẻo), để tránh nhiễm bẩn môi trường.

7.2.4. Các sản phẩm ở trạng thái ổn định được bao gói hoặc không được bao gói

Các mẫu có dạng ngoài bình thường phải được bảo quản, tránh ánh nắng trực tiếp hoặc các nguồn nóng khác, ở nhiệt độ không quá 25°C. Các mẫu khuyết tật nhìn thấy được phải để trong vật chứa kín (thí dụ các túi bằng chất dẻo), để tránh nhiễm bẩn từ môi trường và bảo quản trong tủ lạnh(6.4).

Thịt khô phải bảo quản trong vật chứa kín khí.

Kiểm tra trong vòng 3 ngày.

Trường hợp nghi ngờ, thì xử lý theo 7.2.1.

7.3. Thân thịt, một phần thân thịt hoặc thịt miếng có khối lượng không quá 2 kg và thịt được tách bằng phương pháp cơ học hoặc thịt khô

7.3.1. Thịt tươi

Xem 7.2.1.

7.3.2. Thịt đông lạnh

Xem 7.2.2.

7.3.3. Thịt khô

Xem 7.2.4.

7.3.4. Nước tiết dịch của thịt

Bảo quản các mẫu trong tủ lạnh(6.4).

Kiểm tra mẫu càng sớm càng tốt, nhưng trong mọi trường hợp phải kiểm tra trong ngày nhận mẫu.

7.3.5. Tăm bông

Bảo quản tăm sợi bông hoặc tăm alginat trong tủ lạnh (6.4) ngay sau khi nhận.

Kiểm tra mẫu càng sớm càng tốt, nhưng trong mọi trường hợp phải kiểm tra trong ngày nhận mẫu.

8. Xử lý mẫu phòng thử nghiệm

8.1. Khái quát

Xử lý các mẫu sao cho tránh được nguy cơ nhiễm bẩn, cần theo các chú ý sau đây:

- a) Đảm bảo khu vực làm việc sạch và không có phế thải; không để mẫu trực tiếp dưới ánh nắng;
- b) Làm sạch bề mặt làm việc bằng chất khử trùng thích hợp (5.5) kể cả trước và sau khi kiểm tra;
- c) Khử trùng trước các vật chứa, khay, các thiết bị v.v... và các dụng cụ để xử lý và mở túi hoặc hộp.

Nếu thời gian ủ được qui định (thí dụ, đối với hộp), thì tiến hành theo 8.2.

Các mẫu bị khuyết tật nhìn thấy được thì không ủ.

Trong trường hợp các sản phẩm đông lạnh vẫn ở trạng thái đông lạnh (xem 7.2.2), hoặc các mẫu làm lạnh sau khi lấy mẫu, thì tiến hành theo 8.3. Ở tất cả các trường hợp khác thì tiến hành trực tiếp theo điều 9

8.2. Ủ

Ủ ở nhiệt độ qui định trong thời gian yêu cầu.

Kiểm tra hàng ngày để phát hiện các mẫu bị khuyết tật (thí dụ bị trương phồng, nở do ẩm). Nếu trường hợp này xảy ra, thì ngừng ủ. Ghi lại thời gian ủ và tiến hành theo điều 9.

Cứ hai ngày thì lật hoặc lật ngược vật chứa dung dịch.

Sau khi ủ thì tiến hành theo điều 9.

8.3. Rã đông trong tủ lạnh

Rã đông các mẫu chưa mở trong tủ lạnh (6.4) cho đến khi rã đông hoàn toàn nhưng không quá 24 h. Khi các mẫu cần phải rã đông quá 24 h, thì nên sử dụng các phương pháp lấy mẫu khác.

9. Mở bao gói**9.1. Khái quát**

Làm sạch bên ngoài các bao gói cứng hoặc nửa cứng, bằng xà phòng hoặc chất tẩy và nước, lau khô bằng khăn sạch. Sau đó làm khô bằng giấy thấm, sạch dùng một lần.

Khử trùng phía bên ngoài các bao gói để tránh nhiễm bẩn khi mở. Tuy nhiên, khi bao gói hoặc vật liệu bọc ngoài rất mỏng và có thể quá trình làm sạch làm hư hỏng (phần thịt được bọc trên khay) thì phải bỏ qua quá trình khử trùng. Việc khử trùng phải được tiến hành hết sức cẩn thận.

Không cần thiết phải làm sạch và khử trùng khi bao gói có thể được tháo bỏ mà không có nguy cơ bị nhiễm bẩn.

Tất cả các thao tác trong suốt quá trình mở và sau khi mở phải tiến hành trong điều kiện vô trùng tốt nhất là liên tục; nếu phải gián đoạn, thì phải tiến hành càng nhanh càng tốt.

Trong suốt quá trình nếu phải gián đoạn, thì sản phẩm phải được bảo quản trong tủ lạnh (6.4)

Các mẫu có dạng ngoài bình thường và các mẫu khuyết tật phải được xử lý khác nhau. Tiến hành theo 9.2 và 9.3.

9.2. Mẫu có dạng ngoài bình thường

Tiến hành khử trùng bằng ngọn lửa (có hoặc không có etanol và tránh quá nhiệt), hoặc dùng hỗn hợp khử trùng (5.5) và để khô nhưng không dùng nhiệt.

Mở phần bọc ngoài của thịt trên khay bằng cách tháo bỏ lớp bao gói bắt đầu từ bên dưới khay.

Dùng dao, kéo, kẹp vô trùng để mở các bao gói thịt đóng gói bình thường sau khi khử trùng vô

bọc kín bằng hỗn hợp khử trùng. Mở sản phẩm thịt thái mỏng được đóng gói bằng chân không theo cùng một quy trình.

Khử trùng xúc xích chưa chín hoặc đã chín trong vỏ bọc tổng hợp thấm nước hoặc không thấm nước tại vết rạch, tháo bỏ vỏ bọc.

Đối với xúc xích đã chín thì để nguyên lớp vỏ bọc.

Dùng cái mở hộp vô trùng mở các hộp sau khi đã làm sạch và khử trùng bằng ngọn lửa; khi cần các mẫu thứ cấp (thí dụ ở giữa và bề mặt), thì mở cả hai đáy hộp và đẩy thịt ra ngoài lên khay vô trùng. Không làm hư hỏng các lớp cần kiểm tra.

Dùng dụng cụ thích hợp mà cắt bỏ được lỗ tròn trên nắp để mở lọ thủy tinh.

9.3. Đơn vị mẫu khuyết tật

Mở các đơn vị mẫu khuyết tật trong phòng đặc biệt nơi không dùng để kiểm tra vô trùng.

Khử trùng bằng cách lau sạch với hỗn hợp khử trùng (5.5) và để đến khô nhưng không dùng nhiệt.

Cẩn thận đục thủng hộp và mở bằng dụng cụ mở hộp vô trùng (6.5).

Trong khi mở, tránh nhiễm bẩn người thao tác và môi trường xung quanh.

Tiến hành theo điều 10 hoặc điều 11.

10. Lấy mẫu thứ cấp

Nếu cần có thể lấy mẫu thứ cấp, thí dụ nước tiết dịch của thịt, tằm bông, hoặc phần mẫu tách từ các phần khác nhau của mỗi mẫu (ở giữa, trên bề mặt)

Đối với các mẫu (ban đầu hoặc thứ cấp) cần nghiền nhỏ, và đối với tằm bông, tiến hành theo điều 11.

11. Sự chuẩn bị cuối cùng trước khi kiểm tra, nếu cần

11.1. Nghiền nhỏ

11.1.1. Khái quát

Khi bản chất của vật liệu cần kiểm tra có thể gặp phải khó khăn nếu việc đông hoá thực hiện trực tiếp thì thái nhỏ thành hạt lựu trước. Tiến hành theo 11.1.2. và/ hoặc 11.1.3.

11.1.2. Thái hạt lựu

Đặt thịt lên trên bề mặt thái thịt vô trùng và cắt nhỏ thành hạt lựu khoảng 1cm³ ở điều kiện vô trùng. Tiến hành theo 11.1.3.

11.1.3. Đồng nhất bằng cách thái nhỏ

Đặt thịt (thái hoặc không thái hạt lựu) vào trong thiết bị trộn (6.2) trong điều kiện vô trùng.

Trộn và đông hoá hai lần trong thiết bị trộn, trước khi trộn lần hai thì cho nước tiết dịch của thịt trở lại thiết bị trộn, và tiến hành theo chỉ dẫn trong TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887).

11.2. Xử lý các tằm bông

Lắc các tằm bông trong dịch pha loãng (tằm sợi bông 5.2, tằm alginat 5.3) để phân tán các vi sinh vật bám dính trên tằm bông vào trong chất lỏng.

Để làm được việc đó, cần bẻ gãy phần cán gỗ của tằm bông sao cho có thể lắc được trong các bình nhỏ chứa lượng chất lỏng qui định chứa các viên thủy tinh.

Sự phân tán thu được có thể được pha loãng tiếp theo hệ thập phân.

12. Xử lý tiếp theo

Tham khảo các tiêu chuẩn hiện hành đối với việc xử lý tiếp theo các sản phẩm cần kiểm tra.

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT

Đo độ pH - Phương pháp chuẩn

Meat and meat products - Measurement of pH - Reference method

Soát xét lần 1

TCVN 4835: 2002 thay thế TCVN 4835: 1989;

TCVN 4835: 2002 hoàn toàn tương đương với ISO 2917: 1999;

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp chuẩn để đo giá trị pH trong tất cả các loại thịt và sản phẩm thịt, kể cả thịt gia cầm.

Phương pháp này áp dụng cho các sản phẩm có thể đồng hóa được và cũng dùng để thực hiện phép đo không phá hủy của thân thịt, thịt thăn và thịt bắp.

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 4851 - 89 (ISO 3696), Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm - Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.

3. Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa sau:

3.1. Độ pH của thịt và sản phẩm thịt (pH of meat and meat products): Kết quả phép đo thu được khi thực hiện theo đúng trình tự tiến hành được quy định trong tiêu chuẩn này.

4. Nguyên tắc

Giá trị pH được xác định thông qua phép đo sự chênh lệch điện thế giữa điện cực thủy tinh và điện cực chuẩn được đặt trong mẫu thịt hoặc sản phẩm thịt hoặc dịch chiết của chúng.

5. Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử cấp tinh khiết phân tích, trừ khi có qui định khác.

5.1. Nước, ít nhất phải sử dụng nước phù hợp với loại 3 của TCVN 4851 - 89 (ISO 3696).

Ngoài ra, nước dùng để chuẩn bị các dung dịch đệm phải là nước mới được đun sôi hoặc được làm sạch bằng ni tơ không chứa cacbondioxid để loại cacbondioxid.

5.2. Dung dịch đệm, để hiệu chuẩn pH-met

Có thể sử dụng các dung dịch đệm sau:

- Các dung dịch đệm bán sẵn để sử dụng ngay, có giá trị pH đảm bảo độ chính xác ít nhất đến 0,01 đơn vị pH;
- Các dung dịch đệm được chuẩn bị từ các hỗn hợp dạng khô bán sẵn;

- c) Các dung dịch đệm tự chuẩn bị như mô tả trong 5.2.1 đến 5.2.3.
- 5.2.1. **Dung dịch đệm, pH = 4,00 ở 20°C**
Sấy kali hydro phtalat ở nhiệt độ 110°C đến 130°C đến khối lượng không đổi. Làm nguội đến nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm.
Hoà tan 10,21 g kali hydro phtalat đã sấy như trên với khoảng 800 ml nước cất trong bình định mức một vạch dung tích 1000 ml. Pha loãng bằng nước đến vạch mức và lắc đều.
Giá trị pH của dung dịch này ở 0°C và 10°C là 4,00, ở 30°C là 4,01.
- 5.2.2. **Dung dịch đệm, pH = 6,88 ở 20°C**
Sấy kali dihydro photphat (KH_2PO_4 khan) và dinatri hydro photphat (Na_2HPO_4 khan) ở nhiệt độ từ 110°C đến 130°C đến khối lượng không đổi. Làm nguội đến nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm.
Hoà tan 3,40 g KH_2PO_4 và 3,55g Na_2HPO_4 đã sấy khô với khoảng 800 ml nước trong bình định mức một vạch dung tích 1000 ml. Pha loãng bằng nước đến vạch định mức và lắc đều.
Giá trị pH của dung dịch này ở 0°C là 6,98; ở 10°C là 6,92 và ở 30°C là 6,85.
Dung dịch này có thể bảo quản trong tủ lạnh trong vòng 3 tháng.
- 5.2.3. **Dung dịch đệm, pH = 5,45 ở 20°C.**
Hòa tan 7,01 g axit xitric ngâm một phân tử nước ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) vào khoảng 500 ml nước cất trong bình định mức một vạch dung tích 1000 ml. Thêm 375 ml dung dịch natri hydroxit (5.3), pha loãng bằng nước đến vạch mức và lắc đều.
- 5.3. **Dung dịch natri hydroxit, $c(\text{NaOH}) = 1,0 \text{ mol/l}$.**
Hòa tan 40 g natri hidrroxit trong nước và pha loãng đến 1000 ml.
- 5.4. **Dung dịch kali clorua, $c(\text{KCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$.**
Hòa tan 7,5g kali clorua vào nước trong bình định mức một vạch dung tích 1000 ml, pha loãng bằng nước đến vạch và lắc.
Nếu dùng để đo pH của thịt bắp trước giai đoạn chết cứng, cần thêm vào 925 mg axit iodoaxetic cho mỗi lít dung dịch để đình chỉ sự thủy phân glycogen. Chính pH của dung dịch đến 7,0 bằng dung dịch natri hidroxit (5.3).
- 5.5. **Chất lỏng làm sạch.**
- 5.5.1. Dung dịch dietyl ete, bão hoà trong nước.
- 5.5.2. Dung dịch etanol, ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 95 % phần thể tích
6. **Thiết bị và dụng cụ**
Sử dụng các thiết bị thông thường phòng thí nghiệm và đặc biệt là:
- 6.1. **Thiết bị đồng hóa kiểu cơ học hoặc điện**, có khả năng đồng hóa mẫu phòng thử nghiệm.
Thiết bị này gồm máy cắt quay tốc độ cao, hoặc máy xay gắn một tấm chắn có các lỗ với đường kính không quá 4,0 mm.
- 6.2. **pH - met**, hiển thị bằng kỹ thuật số hoặc kỹ thuật tương tự, với độ chính xác đến 0,01 đơn vị pH.
Nếu không có hệ thống hiệu chỉnh nhiệt độ, cần thực hiện các phép đo ở 20°C. pH met cần được cách ly và bảo vệ, tránh ảnh hưởng của dòng điện cảm ứng gây ra do các dòng điện hoặc nguồn điện bên ngoài trong suốt quá trình đo.

6.3 Điện cực kép

Điện cực tổ hợp bao gồm một điện cực chỉ thị thủy tinh và một điện cực chuẩn Ag/AgCl hoặc Hg/HgCl₂ được nối thông nhau qua một cầu nối điện cực.

Điện cực thủy tinh có thể có hình cầu, hình nón, hình trụ hoặc hình que.

Chú thích: Để tránh các sự cố do các mẫu có nhiều chất béo gây ra, có thể sử dụng điện cực thủy tinh và điện cực chuẩn riêng rẽ bởi cầu nối là chất lỏng để phục hồi pH.

6.4 Máy đồng hoá kiểu trục quay, có thể hoạt động với tần số quay là 20000 vòng/phút.

6.5 Máy khuấy từ

7. Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 4833 - 1 : 2002 (ISO 3100-1[1]).

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

Mẫu đại diện phải có khối lượng ít nhất là 200 g.

8. Chuẩn bị mẫu thử

8.1. Phép đo không phá huỷ

Chọn một vị trí đại diện cho mẫu thử để đo pH. Trình tự tiến hành theo điều 9 của tiêu chuẩn này.

8.2. Phép đo phá huỷ

Đồng hoá mẫu thí nghiệm bằng thiết bị đồng hoá thích hợp (6.1). Cần khống chế để nhiệt độ của mẫu không vượt quá 25°C. Nếu sử dụng máy xay thì phải thực hiện quá trình xay ít nhất 2 lần.

Cho mẫu đã được chuẩn bị vào một vật chứa có nắp đậy kín, phù hợp. Đậy nắp vật chứa lại và bảo quản trong các điều kiện thích hợp để tránh làm hư hỏng mẫu hoặc làm biến đổi thành phần mẫu thử. Tiến hành phân tích mẫu thử càng sớm càng tốt, nhưng thường là trong vòng 24 h sau khi đã đồng hóa.

9. Cách tiến hành.

Chú thích - Nếu phải kiểm tra giới hạn của độ lặp lại (11.2), thì thực hiện hai phép xác định độc lập theo 9.2 đến 9.4 của tiêu chuẩn này.

9.1. Hiệu chuẩn pH - met

Sử dụng hai dung dịch đệm có giá trị pH gần bằng hoặc nằm trong khoảng giá trị pH dự kiến của mẫu thử tại nhiệt độ đo để hiệu chuẩn pH - met (6.2), trong suốt quá trình hiệu chuẩn phải khuấy dung dịch đệm bằng máy khuấy từ (6.5).

Nếu pH-met không có hệ thống hiệu chỉnh nhiệt độ, thì nhiệt độ của dung dịch đệm phải nằm trong khoảng $(20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$

Đối với các sản phẩm đã qua đồng hóa, trình tự tiến hành theo 9.2.

Đối với phép đo không phá huỷ, trình tự tiến hành theo 9.4.

9.2. Phân mẫu thử

Sử dụng máy đồng hoá kiểu trục quay (6.4) để đồng hoá một lượng mẫu thử đã được chuẩn bị (xem 8.2) với một lượng dung dịch kali clorua (5.4) nhiều gấp 10 lần khối lượng mẫu.

Xem thêm 5.4.

9.3. *Đo trên dịch chiết của mẫu*

Đặt các điện cực vào mẫu chiết và hiệu chỉnh hệ thống đặt nhiệt độ của pH-met (6.2) cho phù hợp với nhiệt độ của mẫu chiết. Nếu pH-met không có hệ thống hiệu chỉnh nhiệt độ thì phải duy trì nhiệt độ của mẫu chiết trong khoảng $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Trong khi khuấy bằng máy khuấy từ (6.5), đo độ pH sử dụng qui trình thích hợp đối với pH-met, đọc trực tiếp giá trị pH trên dụng cụ đo, chính xác đến 0,01 đơn vị pH khi đạt giá trị không đổi.

Tiến hành theo 9.5.

9.4. *Đo trực tiếp trên mẫu*

Dùng dao sắc hoặc dụng cụ sắc nhọn khoét hoặc đục một lỗ trên mẫu có kích thước vừa khít với điện cực đặt vào.

Đặt hệ thống hiệu chỉnh nhiệt độ của pH-met (6.2) đến nhiệt độ của mẫu cần đo. Nếu pH-met không có hệ thống hiệu chỉnh nhiệt độ thì phải duy trì nhiệt độ của mẫu chiết trong khoảng $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Đo độ pH sử dụng qui trình thích hợp đối với pH-met. Đọc trực tiếp giá trị pH trên dụng cụ đo, chính xác đến 0,01 đơn vị pH khi đạt giá trị không đổi.

Khi đo pH của thịt tươi ở nhiệt độ từ 0°C đến 5°C , sử dụng pH-met có hệ thống hiệu chỉnh nhiệt độ, nếu cần.

Lập lại phép đo trên cùng một điểm rạch ban đầu.

Lập lại các phép đo tại nhiều điểm khác nhau nếu cần phải xác định sự chênh lệch giá trị pH tại các điểm khác nhau của mẫu.

9.5. *Làm sạch điện cực*

Sử dụng lần lượt các mảnh vải len hoặc vải bông lần lượt thấm dietyl ete (5.5.1) và etanol (5.5.2) để lau sạch các điện cực. Sau đó rửa lại bằng nước cất (5.1) và bảo quản chúng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

10. *Tính toán và biểu thị kết quả*

10.1. *Phép đo không phá hủy*

Lấy kết quả là giá trị trung bình số học của hai giá trị pH đo được tại mỗi vị trí đo. Đọc giá trị pH trung bình số học tại mỗi vị trí đo, chính xác đến 0,05 đơn vị pH.

Khi thực hiện các phép đo tại nhiều vị trí khác nhau của mẫu, cần lập sơ đồ và ghi lại các điểm đo cùng với các giá trị pH trung bình tương ứng đo được.

10.2. *Các sản phẩm đã được đồng hóa*

Đọc kết quả chính xác đến 0,05 đơn vị pH.

11. *Độ chụm*

11.1. *Thử liên phòng thí nghiệm*

Độ chụm của phương pháp thu được bằng kết quả thử liên phòng thí nghiệm tiến hành theo ISO 5725:1986 [2].

11.2. *Độ lặp lại*

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau trong một phòng thí nghiệm, do một người thực

hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong khoảng một thời gian ngắn vượt quá 0,04 đơn vị pH không lớn hơn 5% các trường hợp.

Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r) phải ở khoảng 0,014 đơn vị pH.

11.3. Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau vượt quá 0,12 đơn vị pH không lớn hơn 5% các trường hợp.

Độ lệch chuẩn lặp lại (s_R) phải ở trong khoảng 0,042 đơn vị pH

12. Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- Mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- Phương pháp thử đã dùng, nêu rõ phép đo đã dùng là phá huỷ hay không phá huỷ;
- Tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy chọn cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- Kết quả thu được và nếu kiểm tra độ lặp lại, nêu kết quả thu được.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] TCVN 4833 -1: 2002 Thịt và sản phẩm thịt - Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử - Phần 1: Lấy mẫu

[2] ISO 5725: 1986, Precision of test method - Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests.

[3] TCVN 6910-1: 2001 (ISO 5725-1: 1994) Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.

[4] TCVN 6910-2: 2001 (ISO 5725-2: 1994) Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT

Phương pháp xác định hàm lượng clorua

Meat and meat products
Determination of chloride content

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp chuẩn để xác định hàm lượng clorua của thịt và sản phẩm thịt.

Tiêu chuẩn này phù hợp với ISO 1941 - 1981.

1. Định nghĩa

Hàm lượng clorua của thịt và sản phẩm thịt là hàm lượng clorua toàn phần được xác định theo phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này và được biểu thị bằng phần trăm khối lượng theo natri clorua.

2. Nguyên lý của phương pháp

Chiết xuất một lượng cân với nước nóng và kết tủa các protein.

Sau khi lọc và axit hoá, thêm vào phần chiết một lượng dư dung dịch bạc nitrat và chuẩn độ với dung dịch kali thioxiyanat.

3. Hoá chất và thuốc thử

Tất cả các hoá chất phải là tinh khiết phân tích. Nước cất hoặc nước có độ tinh khiết tương đương

3.1. Nitro benzen

3.2. Dung dịch axit nitric nồng độ xấp xỉ 4mol/ lít

(Có thể coi là “dung dịch khoảng 4 N”)3.

Trộn một thể tích axit nitric đậm đặc (1,39 g/ml = 20 = 1,42 g/ ml) với 3 thể tích nước

3.3. Dung dịch kết tủa protein

3.3.1. Thuốc thử 1

Hoà vào nước 106 g kali hexaxi anoferat (II) trihidrat [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$], chuyển toàn bộ khối lượng đó sang bình định mức dung tích 1000 ml và thêm nước đến vạch mức.

3.3.2. Thuốc thử 2

Hoà 220g kẽm axetat [$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$] vào nước và thêm 30 ml axit axetic băng. Chuyển toàn bộ khối lượng đó sang bình định mức dung tích 1000 ml và thêm nước đến vạch mức.

3.4. Bạc nitrat (AgNO_3) dung dịch thể tích chuẩn.

$c(\text{AgNO}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$ (có thể coi là dung dịch chuẩn 0,1N)

Hoà vào nước 16,989 g AgNO_3 trước đó đã được sấy khô 2 giờ ở nhiệt độ 150°C và để nguội trong bình hút ẩm. Chuyển toàn bộ sang bình định mức dung tích 1000 ml và thêm nước đến vạch mức.

3.5. Dung dịch thể tích chuẩn kali thioxianat

$c(\text{KSCN}) = 0,1 \text{ mol/l}$ (có thể coi là dung dịch chuẩn 0,1N)

Hoà vào nước khoảng 9,7 g KSCN. Chuyển toàn bộ khối lượng sang bình định mức dung tích 1000 ml và thêm nước đến vạch mức. Chuẩn dung dịch chính xác đến 0,0001 mol/l với dung dịch AgNO_3 (3.4) dùng dung dịch sắt III amoni sunfat làm chất chỉ thị (3.7)

3.6. Dung dịch natri hidroxit 1 mol/l (có thể coi là dung dịch 1 N)**3.7. Sắt (III) amoni sunfat [$\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$] dung dịch bão hoà ở nhiệt độ phòng.****3.8. Than hoạt tính****4. Thiết bị**

Sử dụng các thiết bị thông thường của phòng thí nghiệm và các thiết bị sau:

4.1. Máy xay thịt, loại dùng cho phòng thí nghiệm có lắp 1 tấm đĩa được khoan lỗ, các lỗ có đường kính không lớn hơn 4 mm.

4.2. Bình cầu định mức

4.3. Bình nón, dung tích khoảng 250 ml

4.4. Buret, dung tích 25 hoặc 50 ml.

4.5. Pipet định mức, dung tích 20 ml

4.6. Máy đo pH

4.7. Nồi đun cách thủy.

4.8. Cân phân tích.

5. Lấy mẫu

5.1. Lấy ít nhất 200 g mẫu từ mẫu đại diện.

5.2. Bảo quản mẫu.

Nếu cần thiết, cần lưu giữ mẫu sao cho không được làm hư hỏng mẫu và làm thay đổi thành phần của mẫu.

6. Cách tiến hành**6.1. Chuẩn bị mẫu thử**

Làm đều mẫu bằng cách cho mẫu đi qua cối xay thịt ít nhất 2 lần và trộn. Cho đầy mẫu vào một bình có nút đậy kín khí và bảo quản sao cho không được làm hỏng và làm thay đổi thành phần của mẫu. Phân tích mẫu càng sớm càng tốt ngay sau khi làm đồng đều mẫu, nhưng không được quá 24 giờ.

6.2. Lượng mẫu cân

Cân khoảng 10g từ mẫu thử, chính xác đến 0,001g (6.1) và chuyển sang bình nón (4.3)

6.3. Tách protein

Thêm lần lượt 0,5g than hoạt tính (3.8) và 100 ml nước nóng vào lượng mẫu cân (6.2). Đun nóng bình và phần mẫu chứa trong bình 15 phút trong nồi đun cách thủy (4.7) và thỉnh thoảng lắc bình.

Để bình chứa mẫu nguội đến nhiệt độ phòng rồi lần lượt thêm vào 2 ml thuốc thử 1 (3.3.1) và 2 ml thuốc thử 2 (3.3.2), trộn kỹ sau mỗi lần thêm. Dùng dung dịch natri hidroxit (3.6) điều chỉnh pH đến khoảng 7,5 đến 8,3, kiểm tra độ pH bằng máy đo pH (4.6). Để yên bình (có chứa mẫu) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó chuyển toàn bộ khối lượng mẫu trong bình sang bình định mức (4.2) và pha loãng với nước đến vạch mức. Trộn kỹ và lọc qua giấy lọc đã gấp nếp.

Chú thích: Dịch lọc có thể được sử dụng để xác định hàm lượng nitrat và nitrit. Nếu axit ascorbic có mặt trong mẫu thử với nồng độ dưới 0,1%, hoặc nếu phần chiết là chỉ sử dụng để xác định clorua thì không cần thiết thêm than hoạt tính vào quá trình chuẩn bị nước lọc. Hơn nữa, việc điều chỉnh độ pH là không cần thiết nếu chỉ để thực hiện việc xác định clorua.

6.4. Tiến hành xác định

Cho 20 ml dịch lọc vào bình nón (4.3) bằng pipet và thêm vào đó 5 ml dung dịch axit nitric từ ống đong chia độ (3.2) và 1 ml dung dịch sắt (III) amoni sunfat (3.7), làm chất chỉ thị.

Dùng pipet lấy 20 ml dung dịch bạc nitrat (3.4) cho vào bình nón. Thêm vào 3 ml nitro benzen (3.1) lấy từ ống đong chia độ và trộn kỹ. Lắc mạnh để làm đông kết tủa. Chuẩn độ dung dịch trong bình nón với dung dịch kali thioxianat (3.5) cho đến khi xuất hiện màu hồng bền vững. Ghi lại thể tích dung dịch kali thioxianat đã dùng để chuẩn độ, chính xác tới 0,05 ml.

6.5. Thử trắng

Tiến hành phép thử trắng bắt đầu từ mục 6.3 sử dụng cùng thể tích dung dịch bạc nitrat (3.4)

6.6. Số phép xác định: Tiến hành 2 phép xác định trên cùng một mẫu thử (6.1)

7. Trình bày kết quả

7.1. Hàm lượng clorua của mẫu, tính theo natri clorua phần trăm khối lượng, bằng:

$$0,05844(V_2 - V_1) \times \frac{200}{20} \times \frac{100}{m} \times c = 58,44 \times \frac{V_2 - V_1}{m} \times c$$

Trong đó:

V_1 là thể tích tính bằng ml, của dung dịch kali thioxianat (3.5) đã sử dụng hết trong khi tiến hành xác định (6.4)

V_2 là thể tích, tính bằng ml, của dung dịch kali thioxianat (3.5) đã sử dụng hết trong khi làm phép thử mẫu trắng (6.5);

c là nồng độ chính xác của dung dịch kali thioxianat (3.5) tính bằng mol/l;

m là khối lượng tính bằng gam của lượng cân mẫu thử;

Lấy kết quả trung bình số học của 2 phép xác định (6.6) với điều kiện thỏa mãn yêu cầu lặp lại (xem 7.2).

Báo cáo kết quả thử lấy chính xác đến 0,05g cho 100 g mẫu thử

7.2. Độ lặp lại

Chênh lệch kết quả giữa 2 phép xác định tiến hành đồng thời hoặc tiếp nhau nhanh do cùng một người phân tích không được vượt quá 0,2g natri clorua cho 100 g mẫu thử

8. Biên bản thử

Biên bản thử cần chỉ ra phương pháp đã sử dụng và kết quả thu được. Trong biên bản cũng cần đề cập tới bất cứ điều kiện thao tác nào mà không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc coi như tự ý, cũng như bất cứ chi tiết nào mà có thể đã làm ảnh hưởng tới kết quả.

Biên bản thử cần bao gồm toàn bộ các chi tiết yêu cầu cần để nhận biết mẫu thử một cách đầy đủ.

THỊT VÀ SẢN PHẨM CỦA THỊT

Phương pháp xác định dư lượng Penicillin

Meat and meat products
Determination of penicillin residues

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định tổng penicillin tồn dư trong thịt và sản phẩm của thịt, dùng làm thực phẩm cho người và thức ăn gia súc.

1. Đặc tính chung

Penicillin thuộc họ kháng sinh, là chất hữu cơ có phân tử lượng lớn, tồn tại trong thịt và sản phẩm của thịt với hàm lượng rất nhỏ. Họ penicillin gồm nhiều dẫn xuất như benzyl penicillin, potassium penicillin, phenoxymethyl penicillin, ampicillin, anhydrous, bezathyl penicillin G, procaine penicillin G, v.v...

2. Nguyên tắc

Áp dụng phương pháp gián tiếp, dựa vào phản ứng tạo phức đặc trưng và hoàn toàn định lượng của penicillin với thuốc thử phenaltrolin- cadimi sinh ra phức bền. Chiết phức này bằng nitrobenzen và do phổ hấp thụ nguyên tử của kim loại cadimi trong phức ở tương hữu cơ, hay phân huỷ tương hữu cơ lấy cadimi vào axit clohydric, dung dịch 1% và đo phổ của cadimi.

3. Lấy mẫu

Theo TCVN 4833-89 (ST SEV 2433-80)

4. Dụng cụ, thiết bị và hoá chất

4.1. Dụng cụ, thiết bị:

- + Máy phổ hấp thụ nguyên tử SP-9/800 hay loại tương đương
- + Đèn catốt rỗng của cadimi
- + Bếp đun cách thủy
- + Máy xay sinh tố
- + Bình định mức các loại
- + Pipet các loại
- + Cốc chịu nhiệt
- + Phễu chiết 250 ml
- + Một số dụng cụ khác

Ban hành theo quyết định số 736 /QĐ ngày 31 tháng 12 năm 1990 của ủy ban Khoa học Nhà nước

4.2. Hoá chất:

Dùng loại tinh khiết cao 99,99% hay tinh khiết quang phổ (Specpure)

+ Thuốc thử Tris (1,10- Phenaltrolin) Cadimi

+ Dung môi nitrobenzen ($C_6H_5NO_2$)

+ Dung dịch gốc tiêu chuẩn của cadimi nồng độ 1 mg/ml

+ Axit nitric, dung dịch 65%

+ Hydroperoxyt (H_2O_2) dung dịch 30%

+ Dung dịch 1% của 2 axitclohydric và nitric trong nước

+ Nước cất 2 lần.

5. Chuẩn bị thử**5.1. Chuẩn bị mẫu phân tích:**

Mẫu thịt cần phân tích được thái nhỏ, trộn đều, cân 1 lượng 10g cho vào máy xay sinh tố. Thêm vào 30 ml nước cất rồi cho máy chạy trong 5 phút. Chờ toàn bộ huyền dịch vào cốc chịu nhiệt, điều chỉnh pH khoảng 5-6 rồi đun cách thuỷ ở 60-70°C trong 30 phút. Chuyển dung dịch này vào bình định mức và định mức bằng nước cất đến thể tích 50 ml. Sau đó ly tâm lắng cặn, lấy 25 ml dịch nước trong cho tác dụng với 1 lượng dư (15 lần) thuốc thử Tris (1,10- Phenaltrolin) cadimi (khoảng 10 ml). Lắc kỹ trong 10 phút, sau đó cho 5 ml dung môi nitrobenzen và lắc tiếp trong 30 phút. Để yên cho phân lớp hoàn toàn trong phễu chiết rồi tách lấy phần dung môi hữu cơ chứa phức liên hợp ra. Tro hoá ướt dung dịch chiết này bằng 30 ml axit nitric 65% và vài giọt hydroperoxyt 30% trong bình keldan đến khi thu được dung dịch mẫu trong. Chuyển toàn bộ mẫu ra cốc chịu nhiệt và cô cạn để đuổi axit. Sau đó thêm 5 ml axit clohydric 1% vào cốc, chuyển dung dịch này sang bình định mức và định mức bằng axit clohydric 1% đến thể tích 20 ml rồi tiến hành xác định cadimi.

5.2. Pha dãy chuẩn:

Dùng dung dịch gốc tiêu chuẩn của cadimi nồng độ 1 mg/ml và axit clohydric 1% để pha loãng. Tính lượng phù hợp để pha dãy chuẩn có nồng độ của cadimi là 0,1 - 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 - 2,5 $\mu\text{g/ml}$ trong bình định mức có thể tích 25 ml.

5.3. Chuẩn bị mẫu trắng:

Đồng thời với việc chuẩn bị mẫu phân tích phải chuẩn bị thêm mẫu trắng để so sánh và bố chính nền. Mẫu trắng được chuẩn bị như mẫu phân tích nhưng không có mẫu phân tích.

5.4. Các điều kiện thực nghiệm

+ Vạch phổ đo của cadimi 228,8 nm

+ Khe đo máy AAS 0,5 nm

+ Burner: Loại khe dài 10 cm

+ Cường độ đèn catốt rỗng: Dùng 80% giá trị cực đại

+ Hỗn hợp khí: Không khí nén và axetylen 4,2/ 1,2 lít/ phút

+ Tốc độ dẫn mẫu: 4,5-5 ml/phút

+ Thời gian đo: 5-10 giây

+ Các điều kiện khác chọn phù hợp với máy AAS

6. Tiến hành thử

+ Đặt các thông số đã chọn ở mục 5.4 cho máy để đo cadimi

+ Cho máy chạy để ổn định (15 phút)

+ Đo phổ hấp thụ của cadimi lần lượt từ các mẫu chuẩn, mẫu trắng, rồi đến mẫu phân tích. Mỗi mẫu đo 3 lần lấy giá trị là trung bình cộng của 3 lần thử đồng thời có sai lệch giá trị không vượt quá 15%.

+ Hiệu chỉnh giá trị của mẫu trắng (nếu có).

+ Dùng đường chuẩn theo hệ toạ độ D-C. Trong đó D là cường độ của vạch phổ hấp thụ của cadimi trong các mẫu chuẩn tương ứng với các nồng độ C của nó trong dãy chuẩn.

+ Xác định nồng độ C_x của cadimi trong mẫu phân tích theo đường chuẩn trên.

7. Tính kết quả

Tổng hàm lượng của cadimi trong mẫu phân tích được tính theo công thức sau:

$$C = C_x \cdot V$$

Ở đây $V = 20$ ml và C tính bằng μg

Sau khi xác định được hàm lượng cadimi trong mẫu phân tích ta suy ra lượng penicillin theo phản ứng sau:

Penicillin + Tris (1,10 - Phenaltrolin) Cd $\rightarrow$ phức liên hợp Cd (Phenaltrolin)₃ (Penicillin)₂

Theo thành phần của phức liên hợp ta thấy rằng:

1 nguyên tử cadimi tương ứng với 2 phân tử penicillin

hay 112,4 g cadimi tương ứng với 2 mol penicillin

hay 112,4 μg cadimi tương ứng với 2 μmol penicillin

Vậy 1 μg cadimi tương ứng với 2/ 112,4 μmol penicillin

Do đó C μg cadimi μg tương ứng với 2. $C/ 112,4$ μmol penicillin

Suy ra công thức tính hàm lượng tổng penicillin là

$$G = 2 \cdot C/ 112,4 \cdot a$$

Tính bằng $\mu\text{mol/g}$

Chú thích:

Nếu sau khi chiết phức bằng nitrobenzen mà tiến hành đo ngay cadimi trong phức thì mẫu chuẩn cũng phải chiết bằng nitrobenzen rồi mới đo.

Ở đây cần lưu ý vì thuốc thử Tris (1,10 - Phenaltrolin) Cd lấy dư 15 lần nên dãy dung dịch chuẩn không phải là dung dịch cadimi gốc mà là dung dịch penicillin gốc. Sau đó cho lượng dung dịch gốc này tác dụng với lượng dư thuốc thử, sau đó chiết bằng nitrobenzen rồi mới đo và xác định trực tiếp tổng penicillin trong mẫu theo dãy dung dịch chuẩn. Cách này phức tạp và tốn một lượng lớn dung môi nên ta phải tiến hành vô cơ hoá tiếp (như mục 5.1). Theo phương pháp này thì dung dịch chuẩn gốc là dung dịch chứa ion Cd^{2+}

PHỤ LỤC

1. Pha dung dịch gốc tiêu chuẩn của cadimi nồng độ 1mg/ml: Cân 1,1423 g cadimi oxyt bột (CdO), thêm 40 ml axit nitric 6 M, đun nhẹ cho tan hết, để nguội rồi định mức bằng nước cất đến 1 lít. Dung dịch này gọi là dung dịch A.
2. Dung dịch cadimi nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$: Lấy 1ml dung dịch A, pha loãng và định mức bằng axit nitric 1% đến 100 ml. Dung dịch này gọi là dung dịch B.
3. Dung dịch cadimi nồng độ 0,1 $\mu\text{g/ml}$: Lấy 1ml dung dịch B, pha loãng và định mức bằng axit nitric 1% đến thể tích 100 ml.

THỊT VÀ SẢN PHẨM CỦA THỊT

Phương pháp xác định dư lượng kháng sinh Streptomycin

Meat and meat products
Determination of streptomycin residues

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định dư lượng tổng streptomycin tồn dư trong thịt và sản phẩm thịt của thịt, dùng làm thực phẩm cho người và thức ăn gia súc.

1. Đặc tính chung

Streptomycin là 1 bazơ hữu cơ chiết ra từ nấm streptomyces globisporus streptomycin hay từ các loài sinh vật khác hoặc có được bằng các phương pháp tổng hợp. Các streptomycin đều tạo muối với axit vô cơ. Các loại muối của kháng sinh thường là sunfat, clohydrat, photphat và có cả phức chất canxiclorua của streptomycin clohydrat. Các muối này tan trong nước, hầu như không tan trong clorofooc, cồn và ête.

2. Nguyên tắc

Thủy phân streptomycin bằng kiềm cho maltol là Methyl-3-hydroxy-7pyron. Sự tạo thành maltol xảy ra hoàn toàn định lượng cho phép xác định được streptomycin

Maltol sinh ra được tách khỏi hỗn hợp thủy phân bằng cách dùng clorofooc để chiết khỏi dung dịch mẫu trong môi trường axit, sau đó giải chiết maltol bằng dung dịch kiềm trong nước. Cho maltol tác dụng với phen sắt (III) amonium, dung dịch 2% sẽ sinh ra phức màu đỏ tía đặc trưng và đo mật độ quang của phức màu này ở sóng 525 nm để xác định streptomycin. Nồng độ của streptomycin được xác định theo phương pháp đường chuẩn.

3. Lấy mẫu

Theo TCVN 4833-89 (ST SEV 2433-80)

4. Dụng cụ, thiết bị và hoá chất

4.1. Dụng cụ, thiết bị:

- + Máy trắc quang UV-VIS
- + Cuvét thủy tinh có chiều dày 2 cm
- + Máy xay sinh tố
- + Máy ly tâm
- + Bình định mức các loại
- + Pipet các loại
- + Phễu chiết cỡ 250 ml
- + Một số dụng cụ khác

4.2. Hoá chất : Dùng hoá chất có độ tinh khiết phân tích

- Axit clohydric, dung dịch 1M
- Natrihydroxyt, dung dịch 1N
- Thuốc thử: phen sắt (III) amonium, dung dịch 2% trong axit sunfuric 1N
- Clorofooc
- Dung dịch gốc tiêu chuẩn streptomycin sunphat nồng độ 1mg/ml
- Nước cất 2 lần

5. Tiến hành thử**5.1. Chuẩn bị mẫu phân tích**

Mẫu thịt cần phân tích được thái nhỏ, nghiền mịn, trộn đều và cân 1 lượng $a = 20\text{g}$ cho vào máy xay sinh tố. Thêm 10 ml nước cất vào và cho máy chạy trong 5 phút. Cho 5 ml axit clohydric 1 M vào và định mức đến 50 ml bằng nước cất. Đun trong bếp cách thuỷ sôi trong 10 phút. Để nguội, ly tâm lắng cặn, lấy dung dịch nước trong cho vào phễu chiết, thêm 10 ml clorofooc, lắc trong 10 phút sau đó để yên trong 15 phút cho phân lớp hoàn toàn trong phễu chiết rồi tách lấy tương hữu cơ vào phễu chiết khác, thêm 2 ml natrihydroxyt 1N và 4 ml thuốc thử phen sắt (III) amonium 2% trong axit và nước cất đến 20 ml. Lắc mạnh trong 30 phút, sau đó để yên trong 20 phút rồi tách lấy phần dung dịch nước. Dung dịch này dùng để đo mật độ quang, xác định streptomycin ở bước sóng 525 nm.

5.2. Pha dãy chuẩn

Dùng dung dịch gốc tiêu chuẩn của streptomycin sunphat nồng độ 1 mg/ml, tính toán lượng phù hợp để pha dãy dung dịch chuẩn có nồng độ 0,1 - 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 - 2,5 $\mu\text{g/ml}$ trong các bình định mức có thể tích 20 ml sau đó thuỷ phân bằng kiềm, đun cách thuỷ cho sôi 10 phút, để nguội rồi cho 2 ml dung dịch thuốc thử phen sắt (III) amonium 2%, định mức bằng nước cất đến 20 ml rồi để sau 20 phút mới tiến hành đo.

5.3. Mẫu trắng

Mẫu trắng phải được chuẩn bị cùng một điều kiện như mẫu phân tích nhưng thay mẫu phân tích trên bằng nước cất sao cho có cùng thể tích

6. Tiến hành thử

- + Đặt sóng đo và bật máy chạy cho ổn định (5 phút);
- + Đo mật độ quang của mẫu chuẩn và mẫu phân tích ở bước sóng 525 nm bằng Cuvét có chiều dày 2 cm. Dùng mẫu trắng ở kênh so sánh làm mẫu so sánh và đo mỗi mẫu 3 lần;
- + Lập đồ thị đường chuẩn theo hệ toạ độ D-C. Trong đó D là mật độ quang của dung dịch mẫu chuẩn có nồng độ C tương ứng ;
- + Xác định nồng độ C_x của chất phân tích theo đường chuẩn đã dựng được.

7. Tính kết quả

Hàm lượng của streptomycin trong mẫu phân tích được tính theo công thức sau:

$$C_o = (C_x \cdot V) / a \quad \text{Tính bằng g/g}$$

Trong đó:

a là lượng mẫu cân (ở đây $a = 20\text{ g}$)

V là thể tích pha mẫu ($V = 20\text{ ml}$)

C_x là nồng độ streptomycin xác định được theo đường chuẩn

PHỤ LỤC CÁCH PHA DẦY CHUẨN

Sử dụng dung dịch gốc tiêu chuẩn của streptomycin có nồng độ 1mg/ml (gọi là dung dịch A)

- Pha dung dịch streptomycin nồng độ 10 µg/ml: lấy 1ml dung dịch A, pha loãng và định mức bằng nước cất đến 100 ml (dung dịch này gọi là B)

- Pha dầy dung dịch chuẩn: Lấy 6 bình định mức có thể tích 20 ml cho lần lượt vào các bình từ số 1 đến số 6 một lượng như sau: 0,2 - 1,0 - 2,0 - 3,0 - 4,0 - 5,0 ml dung dịch B. Thêm vào mỗi bình 2 ml natrihydroxyt 1N và lượng nước đến 10 ml. Đun cách thủy cho sôi để thủy phân trong 10 phút. Để nguội ở nhiệt độ phòng, thêm 4 ml thuốc thử phen sắt (III) amonium 2% trong axit, lắc kỹ và định mức bằng nước cất đến 20 ml.

Như vậy, ta được dầy dung dịch chuẩn có nồng độ là : 0,1 - 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 - 2,5 µg/ml.

THỊT VÀ SẢN PHẨM CỦA THỊT

Phương pháp xác định dư lượng kháng sinh aureomycin

Meat and meat products
Determination of aureomycin residues

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định kháng sinh aureomycin (tên hoá học là clotetracylin) tồn dư trong thịt và sản phẩm của thịt, dùng làm thực phẩm cho người và thức ăn gia súc.

1. Đặc tính chung

Họ tetracyclin là một nhóm kháng sinh gồm các dẫn xuất như: tetracyclin, clotetracylin, oxytetracylin... là những kháng sinh tương đối mạnh và bền. Đối với người và động vật, nó nhiễm vào dưới tác dụng của thuốc chữa bệnh như uống hoặc tiêm và tồn tại trong máu, tế bào hay dịch của cơ thể động vật. Hàm lượng của chúng lớn hay nhỏ là tùy thuộc quá trình sử dụng thuốc đó nhiều hay ít, thời gian sử dụng lâu hay mau và khả năng tự loại của cơ thể. Vì vậy, người ta thường kiểm tra hàm lượng của chúng trong máu, serum hay trong nước tiểu sau thời gian sử dụng thuốc.

2. Nguyên tắc

Dùng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (viết tắt là HPLC) để xác định riêng aureomycin. Trước hết, chất cần phân tích phải được chiết ra khỏi dung dịch mẫu bằng hệ dung dịch đệm phù hợp, sau đó bơm dung dịch này vào cột sắc ký HPLC có chứa chất nhồi (pha tĩnh) là nhựa RP-18, khi đó aureomycin bị hấp thụ lên pha tĩnh này. Muốn xác định chất cần phân tích, người ta rửa giải nó khỏi cột sắc ký bằng một hệ dung môi phù hợp (pha động). Aureomycin bị pha động tách ra khỏi cột sắc ký ra ngoài và được phát hiện bằng detector UV-VIS ở sóng 355 nm. Nồng độ chất phân tích được xác định bằng phương pháp đường chuẩn. Bằng cách này có thể tách và xác định đồng thời 3 kháng sinh họ tetracyclin nói ở mục 1.

3. Lấy mẫu

Theo TCVN 4833-89 (ST SEV 2433-80)

4. Dụng cụ, thiết bị và hoá chất

4.1. Dụng cụ, thiết bị

- + Hệ thống HPLC với detector UV-VIS hay loại tương đương
- + Máy li tâm
- + Bình định mức các loại

Ban hành theo quyết định số 736/QĐ ngày 31 tháng 12 năm 1990 của ủy ban Khoa học Nhà nước

- + Pipét các loại
- + Cốc chịu nhiệt
- + Cột sắc ký loại 150 x 4,6 mm hay 150 x 2 mm
- + Một vài dụng cụ khác.

4.2. Hoá chất: Dùng loại tinh khiết cho HPLC

- + Chất nhồi cột: Nhựa RP-18 cỡ 5 μm ϕ .
- + Natriclorua (NaCl), dung dịch 0,01 M; natripeclorat, dung dịch 0,01 M; natridihydrophotphat (NaH_2PO_4), dung dịch 0,02 M.
- + Axit photphoric (H_3PO_4), dung dịch 85% và 0,1 M.
- + Dung dịch N,N-Dimethyormamid 40% trong nước.
- + Hệ đệm xitrat-phốtphat pH ~8 và 6,4.
- + Dung dịch gốc tiêu chuẩn của aureomycin nồng độ 1 mg/ml.
- + Nước cất 2 lần.

5. Chuẩn bị thử

5.1. Chuẩn bị mẫu phân tích

Mẫu thịt cần phân tích được thái nhỏ, nghiền mịn, trộn đều và cân 1 lượng 10g, thêm 5 ml MeOH và 5 ml hệ đệm xitrat-phốt phát, lắc kỹ trong 15 phút. Chuyển hỗn dịch này sang bình định mức và định mức bằng nước cất đến thể tích $V = 25$ ml, sau đó ly tâm lắng cặn, lấy phần dung dịch nước trong. Dung dịch này sẽ được bơm trực tiếp vào cột sắc ký để phân tích aureomycin.

5.2. Pha dãy chuẩn

Dùng dung dịch gốc tiêu chuẩn của aureomycin có nồng độ 1mg/ml tính lấy lượng phù hợp để pha và định mức bằng nước cất trong bình định mức có thể tích 25 ml, sao cho nồng độ aureomycin trong các bình là 2-4-6-8-10-12 g/ml

5.3. Mẫu trắng

Đồng thời với việc chuẩn bị mẫu phân tích phải chuẩn bị thêm mẫu trắng để so sánh và bố chính nền. Mẫu trắng được chuẩn bị như mẫu phân tích nhưng không có mẫu phân tích.

5.4. Các điều kiện thực nghiệm

- + Hệ thống HPLC với détecto UV-VIS sóng đo 355 nm
- + Cột tách HPLC: 150 x 4,6 mm nhồi nhựa RP-18 cỡ 5 μm ϕ
- + Máy ghi píc (Recorder) có thể ghi 5-10 mV và tốc độ giấy là 2mm/phút
- + Pha động: Dung dịch N,N-Dimethylformamid có chứa natriclorua 0,01M; natripeclorat 0,1M; natridihydrophotphat 0,02M. Chỉnh pH $\approx 3,3$ bằng axit photphoric 0,1M.
- + Tốc độ pha động: 1 ml/phút
- + Lượng mẫu bơm vào cột là 50 μl / mỗi lần thí nghiệm
- + Nhiệt độ sắc ký: 22-25°C
- + Các điều kiện khác chọn phù hợp với hệ HPLC.

6. Tiến hành thử

- + Đặt các thông số đã chọn ở mục 5.4 cho máy
- + Cho máy chạy, bơm pha động để ổn định cột tách và đường nền. Khi đường nền thẳng là được
- + Bơm lần lượt các mẫu chuẩn, mẫu trắng, rồi đến mẫu phân tích vào cột tách (mỗi mẫu bơm 3 lần lấy giá trị trung bình) và ghi pic sắc ký của chúng
- + Hiệu chỉnh giá trị của mẫu trắng (nếu có)
- + Dựng đường chuẩn theo hệ toạ độ H-C. Trong đó H là chiều cao của pic sắc ký tương ứng với các nồng độ C của mẫu chuẩn
- + Xác định nồng độ C_x theo đường chuẩn trên

7. Tính kết quả

Hàm lượng aureomycin trong mẫu phân tích được tính theo công thức sau đây:

$$C_0 = (C_x \cdot V) / a \quad \text{Tính bằng } \mu\text{g/g.}$$

Trong đó: a là lượng mẫu cân để phân tích và định mức bằng thể tích V ml. Theo mục 5.1 thì a = 10 g và V = 25 ml là nồng độ aureomycin tìm được qua đường chuẩn của dung dịch phân tích.

THỊT VÀ SẢN PHẨM CỦA THỊT

Phương pháp xác định dư lượng hoócmon thyroxin

Meat and meat products
Determination of thyroxin residues

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hoócmon thyroxin tồn dư trong thịt và sản phẩm của thịt, dùng làm thực phẩm cho người và thức ăn gia súc.

1. Đặc tính chung

Thyroxin tên hoá học là 3,3,5,5-Tetra-Iodo-Tyroxin là một loại hoócmon. Trong thực phẩm (chủ yếu là thịt động vật) có chứa hàm lượng rất nhỏ chất này (thường từ cỡ nanôgam đến micrôgam). Để phân tích định lượng, trước hết phải chiết nó ra khỏi mẫu, sau đó xác định bằng các phương pháp phân tích có độ nhạy cao. Ngày nay để xác định thyroxin, người ta thường dùng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC)

2. Nguyên tắc

Sau khi xử lý mẫu, thyroxin được chiết vào dung dịch đệm phù hợp. Thí dụ đệm xitrat-phốtphat. Lấy phần dung dịch này bơm vào hệ HPLC với chất nhồi (pha tĩnh) là nhựa RP - 8, RP -18 hay Hypersil CDS. Khi đó, thyroxin bị hấp thụ trên chất nhồi trong cột sắc ký. Để tách và phân tích thyroxin, người ta rửa giải nó bằng hỗn hợp dung môi (pha động) gồm MeOH/H₂O với tỷ lệ 65/35 có thêm chất đệm và chất phụ gia axit propylic. Thyroxin ra khỏi cột sắc ký được phát hiện bằng detector UV ở sóng 240 nm và nồng độ của nó được xác định theo phương pháp đường chuẩn.

3. Lấy mẫu

Theo TCVN 4833-89 (ST SEV 2433-80)

4. Dụng cụ, thiết bị và hoá chất

4.1. Dụng cụ, thiết bị:

- + Hệ máy HPLC với detector UV
- + Máy li tâm
- + Máy lắc
- + Phễu, chiết cỡ 250 ml
- + Bình định mức các loại
- + Pipet các loại
- + Cốc chịu nhiệt

- + Cột sắc ký loại 250 x 3,2 mm
- + Một vài dụng cụ khác

4.2. **Hoá chất:** Dùng loại tinh khiết cho HPLC

- + Chất nhồi cột RP - 8 hay RP - 18 cỡ của $\phi = 5-7 \mu\text{m}$
- + Đệm xitrat- photphat pH = 8 và 6,4
- + Natrihydro cacbonat (NaHCO_3), dung dịch 0,1 và 1M
- + Thuốc thử Methanolic
- + Trifluoro axetic axit
- + Methanol (CH_3OH)
- + Nước cất 2 lần
- + Dung dịch gốc tiêu chuẩn của thyroxin nồng độ 1 mg/ml

5. **Chuẩn bị thử.**

5.1. **Chuẩn bị mẫu phân tích**

Mẫu thịt cần phân tích được thái nhỏ, nghiền mịn, trộn đều và cân một lượng bằng 10 g cho vào bình nón. Thêm 5 ml dung dịch đệm xitrat-phốt phát pH = 8. Đậy nút lại lắc kỹ trong 30 phút. Lọc hay li tâm lấy dung dịch trong, thêm 1ml natrihydrocacbonat 0,1M và 2 ml thuốc thử methanolic, lắc kỹ và để trong chậu nước đá trong 30 phút. Sau đó làm bay hơi đến cạn ở 30-35°C. Thêm 0,5 ml trifluoro axetic axit, lắc nhẹ và để nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó trung hoà bằng 2-4 ml natrihydrocacbonat, dung dịch 1M. Ly tâm lấy kết tủa, hoà tan kết tủa này trong hỗn hợp methanol / natrihydrocacbonat 0,1 M với tỷ lệ 1/1 (về thể tích) và định mức bằng nước cất đến 10 ml sau đó ly tâm lấy dung dịch trong bơm vào cột sắc ký để phân tích thyroxin.

5.2. **Pha dãy dung dịch chuẩn:**

Dùng dung dịch gốc tiêu chuẩn của thyroxin nồng độ 1mg/ml, tính lấy lượng phù hợp để pha và định mức bằng nước cất đến 25 ml sao cho nồng độ thyroxin trong các bình định mức là 2-4-6-8-10-12 $\mu\text{g/ml}$

5.3. **Mẫu trắng**

Mẫu trắng phải được chuẩn bị cùng một điều kiện như mẫu phân tích nhưng không có mẫu phân tích, và vì vậy phải tiến hành làm đồng thời với mẫu phân tích

5.4. **Các điều kiện thực nghiệm**

- + Hệ thống HPLC với detector UV sóng đo 240 nm
- + Cột tách HPLC: 250 x 3,2 mm nhồi nhựa RP -18 có cỡ hạt 5-7 μm ϕ
- + Máy ghi pic sắc ký (recorder) có thể ghi 10-20 mV và tốc độ giấy là 5-10 mm/phút
- + Pha động: methanol /dung dịch đệm xitrat-phốt phát pH-6 và tỷ lệ là 60/40 (về thể tích)
- + Tốc độ pha động: 1 ml/ phút
- + Lượng mẫu bơm vào cột: 50 μl / 1 lần thí nghiệm.
- + Nhiệt độ thí nghiệm là 25°C
- + Các điều kiện khác chọn phù hợp với hệ HPLC

5. **Tiến hành thử**

- Đặt các thông số đã chọn ở mục 5.4 cho máy HPLC
- Cho máy chạy, bơm pha động để ổn định cột tách và đường nền. Khi đường nền thẳng là được
- Bơm lần lượt các mẫu chuẩn, mẫu trắng rồi đến mẫu phân tích (mỗi mẫu bơm 3 lần lấy giá trị trung bình) vào cột tách và ghi pic sắc ký tương ứng.
- Hiệu chỉnh giá trị của mẫu trắng (nếu có)
- Dựng đường chuẩn theo hệ tọa độ H-C. Trong đó H là chiều cao của pic sắc ký tương ứng với các nồng độ C của chuẩn
- Xác định nồng độ Cx của mẫu phân tích theo đường chuẩn

7. **Tính kết quả**

Hàm lượng thyroxin, tính bằng dlg/g , trong mẫu phân tích được tính theo công thức sau:

$$C_0 = (C_x \cdot V) / a$$

Trong đó: a là lượng mẫu thịt để phân tích (10g) và định mức trong thể tích V ml. Theo mục 5.1 thì V = 10 ml. Cx là nồng độ thyroxin của dung dịch phân tích tìm được qua đường chuẩn.

THỊT VÀ SẢN PHẨM CỦA THỊT
Phương pháp xác định hàm lượng chì (P_b)
Meat and meat products
Determination of lead content

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng chì có trong thịt và sản phẩm của thịt dùng làm thực phẩm cho người và thức ăn gia súc.

1. Đặc tính chung

Chì thuộc nhóm kim loại nặng gây độc cho người và gia súc, nó tồn tại ở dạng nguyên tố và các muối của nó. Đặc biệt, chì dễ tan ở nhiệt độ cao, tồn tại trong thịt và sản phẩm của thịt với hàm lượng rất nhỏ dưới dạng hợp chất cơ kim.

2. Nguyên tắc

Mẫu thịt cần phân tích được tro hoá ở 550°C có chất bảo vệ là muối magiênitrat, dung dịch 2% trong nước. Sau đó hoà tan tro thu được trong axit clohydric, dung dịch 6M, đuổi axit dư, định mức đến thể tích nhất định và xác định chì trong mẫu bằng phép đo phổ hấp thụ nguyên tử. Nồng độ chì trong mẫu phân tích được phát hiện theo phương pháp đường chuẩn.

Nếu hàm lượng chì trong mẫu quá bé thì phải làm giàu bằng phương pháp chiết với MIBK có mặt thuốc thử APDC rồi xác định chì trong tương hữu cơ MIBK cũng bằng phép đo AAS.

3. Lấy mẫu

Theo TCVN 4833 - 89 (ST SEV 2433 - 80)

4. Dụng cụ, thiết bị và hoá chất

4.1. Dụng cụ, thiết bị:

- + Máy phổ hấp thụ nguyên tử SP-9/800 hay loại tương đương
- + Lò nung loại 1.000°C
- + Bếp đun cách thuỷ
- + Bình định mức các loại
- + Pipét các loại
- + Cốc chịu nhiệt

Ban hành theo Quyết định số 736/QĐ ngày 31 tháng 12 năm 1990 của Ủy ban Khoa học Nhà nước.

- + Chén nung bằng thạch anh cỡ 100 ml
- + Phễu chiết cỡ 250 ml
- + Một số dụng cụ khác.

4.2. Hoá chất: Dùng loại tinh khiết cao 99,99% hay tinh khiết quang phổ (Specpure):

- Axit clohydric, dung dịch 35% và 1%
- Axit nitric dung dịch 65% và 1%
- Dung dịch gốc tiêu chuẩn của chì nồng độ 1 mg/ml trong axit nitric, 1%
- Lantanclorua (LaCl_3), dung dịch 10% trong axit clohydric 1%
- Magiênitrat, dung dịch 2% trong nước
- Thuốc thử APDC, dung dịch 2% trong nước (APDC: Amonium pyrolydine dithiocarbamat)
- Dung môi hữu cơ MIBK (Methyl izo butyl keton) đã bão hoà nước
- Natrihydroxyt, dung dịch 1% trong nước
- Nước cất 2 lần.

5. Chuẩn bị thử

5.1. Chuẩn bị mẫu phân tích:

Mẫu thịt cần phân tích được thái nhỏ, nghiền mịn, trộn đều, cân 10g vào chén nung, thêm 5 ml magiênitrat 2%, khuấy đều, sấy khô, lúc đầu ở 120°C đến khô, thêm 5 ml axit nitric 1%, lại sấy khô, sau đó đưa vào lò nung. Nâng dần nhiệt độ từ 300°C đến 550°C , cứ 50 phút tăng 50°C , đến khi đạt được 550°C thì giữ trong 2 giờ liên tục.

Lấy tro thu được tẩm ướt bằng nước cất, thêm 8 ml axit clohydric, 6M và 5 giọt axit nitric 65%, đun nhẹ cho tan hết, làm bay hơi để đuổi axit dư, thêm 1 ml lantanclorua 10% rồi chuyển dung dịch này vào bình định mức và định mức bằng axit clohydric 1% đến thể tích 20 ml (có thể đến 10 ml). Dung dịch này dùng để xác định chì.

Nếu dung dịch mẫu trên không phát hiện được chì thì cân lượng mẫu lớn hơn và chiết để làm giàu bằng MIBK có sự có mặt của thuốc thử APDC 2% ở môi trường pH-3 để chiết chì vào tương hữu cơ, sau đó tách lấy pha hữu cơ để xác định chì. ở đây mẫu phân tích và mẫu chuẩn phải cùng chiết vào MIBK trong cùng 1 điều kiện thí nghiệm.

5.2. Pha dãy chuẩn:

Dùng dung dịch gốc tiêu chuẩn của chì nồng độ 1 mg/ml pha loãng và định mức bằng axit clohydric 1%; tính lượng phù hợp để pha dãy chuẩn có nồng độ: 1 - 2 - 4 - 6 - 8 $\mu\text{g/ml}$ trong thể tích 25 ml như bảng dưới đây:

	C1	C2	C3	C4	C5
Nền lantanclorua (%)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Magiênitrat %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Axit clohydric (g)	1	1	1	1	1
Chì ($\mu\text{g/ml}$)	1	2	4	6	8

5.3. Chuẩn bị mẫu trắng:

Đồng thời với việc chuẩn bị mẫu phân tích phải chuẩn bị thêm mẫu trắng để so sánh và bổ chính nền.

Mẫu trắng được chuẩn bị như mẫu phân tích nhưng không có mẫu phân tích.

5.4. Các điều kiện thực nghiệm:

- + Vạch phổ đo của chì 283,3 nm hay 217 nm
- + Khe đo máy AAS: 0,5 nm
- + Burner: loại khe dài 10 cm
- + Cường độ đèn catốt rỗng: dùng 70% giá trị cực đại
- + Hỗn hợp khí: không khí nén và axetylen 4,2/1,2 lít/phút
- + Tốc độ dẫn mẫu: 5 ml/phút
- + Thời gian đo: 10 giây
- + Các điều kiện khác chọn phù hợp với máy AAS.

6. Tiến hành thử

- + Đặt các thông số đã chọn cho máy ở mục 5.4 để đo chì
- + Cho máy chạy để ổn định (15 phút)
- + Đo phổ hấp thụ của chì lần lượt từ các mẫu chuẩn, mẫu trắng, rồi đến mẫu phân tích. Mỗi mẫu đo 3 lần. Kết quả là trung bình cộng của 3 lần thử đồng thời có sai lệch giá trị không vượt quá 15%.
- + Hiệu chỉnh giá trị của mẫu trắng (nếu có)
- + Dựng đường chuẩn theo hệ toạ độ D - C. Trong đó D là cường độ của vạch phổ hấp thụ của chì trong các mẫu chuẩn tương ứng với các nồng độ Cx của nó trong dãy chuẩn.
- + Xác định nồng độ Cx của chì theo đường chuẩn trên.

7. Tính kết quả

Hàm lượng của chì trong mẫu phân tích được tính theo công thức sau:

$$Co = (Cx \cdot V \cdot F) / a \quad \text{Tính bằng } \mu\text{g/g}$$

Trong đó: a là số gam mẫu thịt cân để xử lý và định mức thành thể tích V ml (như trên V = 20 ml). F là hệ số pha loãng mẫu khi đo. Nếu không pha loãng thì F = 1.

PHỤ LỤC

1. Phần chú thích của mục 7 TCVN 5152 - 90

2. Cách pha dãy dung dịch chuẩn của chì

+ Dung dịch thì nồng độ mg/ml: cân 1,5980 g chì nitrat $Pb(NO_3)_2$ tinh thể, tắm ướt bằng vài giọt axit nitric 15%, thêm 50 ml axit nitric 5%, lắc cho tan, định mức bằng nước cất đến 1 lít. Dung dịch này gọi là dung dịch A.

+ Dung dịch chì nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$: lấy 1 ml dung dịch A, pha loãng và định mức bằng axit nitric 1% đến 100 ml. Dung dịch này gọi là dung dịch B.

+ Dung dịch chì nồng độ 0,1 $\mu\text{g/ml}$: lấy 1 ml dung dịch B pha loãng và định mức bằng axit nitric 1% đến 100 ml.

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT

Phương pháp xác định hàm lượng thuỷ ngân (Hg)

Meat and meat products
Determination of mercury content

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng thuỷ ngân có trong thịt và sản phẩm của thịt dùng làm thực phẩm cho người và thức ăn gia súc.

1. Đặc tính chung

Thuỷ ngân thuộc nhóm kim loại nặng gây độc cho người và gia súc, tồn tại ở dạng nguyên tố và các muối của nó. Thuỷ ngân dễ bay hơi, có ở trong thịt và sản phẩm của thịt với hàm lượng rất nhỏ (lượng vết cỡ nanogam) dưới dạng các hợp chất cơ kim.

2. Nguyên tắc

Áp dụng phép đo phổ hấp thụ nguyên tử để xác định lượng vết thuỷ ngân tồn dư trong thịt và sản phẩm của thịt. Trước hết nó được tách ra khỏi mẫu vào dung dịch ở dạng muối Hg^{2+} và bằng phương pháp hoá hơi lạnh, sau đó đo phổ hấp thụ nguyên tử của nó. Nồng độ của thuỷ ngân được xác định theo phương pháp đường chuẩn .

3. Lấy mẫu

Theo TCVN 4833 -89 (ST SEV 2433 -80)

4. Dụng cụ, thiết bị và hoá chất

4.1. Dụng cụ, thiết bị:

- + Máy phổ hấp thụ nguyên tử SP - 9/800 hay loại tương đương
- + Bộ phận nguyên tử hoá lạnh cho thuỷ ngân (Hydridekit)
- + Đèn catốt rỗng của thuỷ ngân
- + Bếp cách thuỷ
- + Bình định mức các loại
- + Pipet các loại
- + Cốc chịu nhiệt
- + Máy khuấy từ

Ban hành theo quyết định số 736 /QĐ ngày 31 tháng 12 năm 1990 của ủy ban Khoa học Nhà nước

- + Bơm hút chân không và nén khí
- + Một số dụng cụ khác.

4.2. **Hoá chất:**

- Dùng loại tinh khiết cao 99,99% hay tinh khiết quang phổ (Specpure)
- + Axit sunfuric 98% và axit clohydric, dung dịch 1M
- + Kali pemanganat (KMnO_2), dung dịch 6% trong nước
- + Magiêpeclorat ($\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ tinh thể (để làm khô))
- + Dung dịch khử: 100 ml axit sunfuric 98% + 600 ml nước cất + 5g natri clorua (NaCl) + 10 g hydroxylaminsunfat ($(\text{NH}_2\text{OH})_2 \text{H}_2\text{SO}_4$) + 20 g thiếc sunfat (SnSO_4). Sau đó định mức bằng nước cất đến 1 lít.
- + Nước cất 2 lần.

5. **Chuẩn bị thử**

5.1. **Chuẩn bị mẫu phân tích:**

Mẫu thịt cần phân tích được thái nhỏ, nghiền mịn, trộn đều, cân 10g (bằng cân phân tích) cho vào bình Keldan, thêm dần 10 - 15 ml axit sunfuric 98% vào và lắc trong nồi cách thuỷ ở nhiệt độ 50 - 60°C cho đến khi mẫu tan hết, chuyển dung dịch này sang bình định mức 50 ml và để lắng 1 giờ trong nước đá.

Thêm dần 15ml kali pemanganat 6% vào bình vừa cho vừa lắc sau đó để yên 30 phút ở nhiệt độ phòng. Định mức bằng axit clohydric 1M đến thể tích 50 ml (V). Bình đựng mẫu phân tích phải được đậy kín bằng nút nhựa PE. Mẫu ở trạng thái này có thể bảo quản 1 ngày mà không mất thuỷ ngân

5.2. **Pha dãy chuẩn:**

Dùng dung dịch gốc tiêu chuẩn của thuỷ ngân nồng độ 1mg/ml, pha loãng và định mức bằng axit clohidric 1M để được dãy dung dịch có nồng độ 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 $\mu\text{g/ml}$ trong bình định mức 50 ml. Dãy dung dịch này pha và dùng cho từng ngày

5.3. **Chuẩn bị mẫu trắng:**

Đồng thời với việc chuẩn bị mẫu phân tích phải chuẩn bị thêm mẫu trắng để so sánh và bố chính nền. Mẫu trắng được chuẩn bị như mẫu phân tích nhưng không có mẫu phân tích.

5.4. **Các điều kiện thực nghiệm:**

- + Vạch phổ đo của thuỷ ngân 273,7 nm
- + Khe đo máy AAS: 0,5 nm
- + Cường độ đèn catôt rỗng: Dùng 80% giá trị cực đại
- + Thời gian đo: 5 - 10 giây
- + Các điều kiện khác chọn phù hợp với máy AAS

6. **Tiến hành thử**

- + Đặt các điều kiện ở mục 5.4 cho máy đo AAS
- + Lắp hệ thống nguyên tử hoá lạnh vào máy
- + Cho máy chạy không cho ổn định (15 phút)
- + Đưa mẫu vào và đo phổ hấp thụ của thuỷ ngân lần lượt từ mẫu chuẩn, mẫu trắng, mẫu phân tích. Mỗi mẫu đo 3 lần lấy giá trị trung bình. Kết quả là trung bình cộng của 3 lần thử đồng thời

có sai lệch giá trị không vượt quá 15%. Giới hạn phát hiện của phép đo thủy ngân ở đây là 0,01 µg/ml.

+ Hiệu chỉnh giá trị của mẫu trắng (nếu có)

+ Dụng đường chuẩn theo hệ tọa độ D - C. Trong đó D là cường độ của vạch phổ hấp thụ của thủy ngân trong các mẫu chuẩn tương ứng với các nồng độ C của nó.

+ Xác định nồng độ C_x của thủy ngân trong mẫu theo đường chuẩn đã dựng được.

7. Tính kết quả

Hàm lượng của thủy ngân trong mẫu phân tích được tính theo công thức sau:

$$C_0 = (C_x \cdot V \cdot F) / a \text{ Tính bằng } \mu\text{g/g}$$

Trong đó : a là số g thịt cân để phân tích và định mức thành thể tích V ml (như trên V = 50 ml) .
F là hệ số pha loãng mẫu khi đo. Nếu không pha loãng thì F = 1.

Chú thích: Nếu với lượng mẫu như đã nói ở trên mà giá trị C_x nhỏ hơn giới hạn phát hiện của phép đo thì có thể tăng giá trị a lên 2 - 3 lần nhưng lượng thuốc thử chỉ cần tăng 70 - 80% là đủ chứ không phải tăng như lượng mẫu vì như vậy sẽ quá dư.

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT

Phương pháp phát hiện Salmonella

Meat and meat products
Detection of Salmonella

Trên cơ sở tiêu chuẩn TCVN 4829-89 hướng dẫn chung về các phương pháp phát hiện Salmonella. Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện Salmonella trong thịt và sản phẩm của thịt dùng làm thực phẩm cho người và thức ăn gia súc.

1. Đặc tính chung

Vi khuẩn hình gậy, mập, ngắn, gram âm, kích thước 0,5 - 0,7 x 1 - 3 micrômét, hai đầu hơi tròn, không có giáp mô, không có nha bào, di động. Vi khuẩn có những đặc tính sinh hoá và huyết thanh được quy định kiểm nghiệm trong tiêu chuẩn này.

2. Nguyên tắc

Căn cứ vào tính chất sinh hoá và kháng nguyên của vi khuẩn để kết luận.

3. Lấy mẫu

- 3.1. Lấy mẫu trung bình trong từng lô hàng đồng nhất.
- 3.2. Lô hàng đồng nhất là một lượng thịt hoặc sản phẩm của thịt có cùng một tên gọi, cùng loại sản phẩm, cùng mức chất lượng, được đựng trong bao bì cùng kiểu, cùng kích thước, cùng khối lượng, được sản xuất, chế biến, đóng gói, bảo quản trong cùng một cơ sở sản xuất, theo cùng một quy trình công nghệ, trong khoảng một thời gian liên tục, được giao nhận cùng một lần, kiểm tra cùng một lúc và không quá 20 tấn với thịt tươi hoặc lạnh đông, 5 tấn với thịt đã chế biến đóng hộp hoặc đựng trong bao bì.
- 3.3. Mẫu trung bình là lượng sản phẩm bằng 0,1 - 0,2% khối lượng một lô hàng nhưng không ít hơn 3 túi đối với thịt lạnh đông, 10 hộp đối với các loại sản phẩm đã chế biến và được lấy ở các vị trí khác nhau bằng phương pháp ngẫu nhiên.
- 3.4. Trước khi lấy mẫu trung bình phải kiểm tra các giấy tờ, xác định tính đồng nhất, điều kiện bảo quản, ... loại bỏ những kiện không đúng tiêu chuẩn.
- 3.5. Mẫu thử trung bình là lượng sản phẩm bằng 80% mẫu trung bình được dùng như sau:
 - 20% để kiểm tra cảm quan.
 - 20% để kiểm tra lý hoá, kim loại nặng, tồn dư thuốc trừ sâu, thuốc kháng khuẩn.
 - 40% để kiểm tra vi sinh vật.
 - 20% để lưu mẫu.
- 3.6. Mẫu lưu do cơ quan kiểm dịch giữ để thử lại khi cần thiết và được bảo quản theo đúng quy định với từng loại sản phẩm; thịt tươi, thịt lạnh đông ở nhiệt độ không lớn hơn -15°C, các sản phẩm khác không lớn hơn 4°C.

- 3.7. Thời gian lưu mẫu không quá 4 tháng đối với đồ hộp đã thanh trùng và không quá 1 tháng đối với các sản phẩm khác.
- 3.8. Nếu kết quả còn nghi ngờ thì cơ quan kiểm dịch phải thông báo cho chủ hàng biết và lấy mẫu thử lại lần hai với số lượng gấp đôi.
- 3.9. Khi cần thiết cơ quan kiểm dịch được phép gửi mẫu đến các cơ quan chuyên trách trong và ngoài nước để nhờ kiểm nghiệm.
- 3.10. Trong quá trình kiểm tra, lấy và lưu mẫu cần có hồ sơ ghi chép đầy đủ.

4. Thiết bị và dụng cụ

4.1. Thiết bị

- 4.1.1. Phòng cấy vô khuẩn (thanh trùng không khí trong phòng cấy bằng đèn cực tím 1,5 - 2,5 oát/lcm³ trong 3 giờ hoặc xông phóc môn, phenol 5%, ...).
- 4.1.2. Tủ ẩm có điều chỉnh nhiệt độ ổn định 35 - 37 - 43°C.
- 4.1.3. Tủ sấy khô.
- 4.1.4. Tủ hấp ướt.
- 4.1.5. Nồi hấp cách thủy.
- 4.1.6. Tủ lạnh 0 - 4°C.
- 4.1.7. Tủ lạnh -35°C.
- 4.1.8. Nồi cách thủy có điều chỉnh nhiệt độ ổn định từ 35 - 56°C.
- 4.1.9. Cân phân tích có độ chính xác 0,01g và 0,1g.
- 4.1.10. Cân thiên bình 50 - 100g.
- 4.1.11. Máy đo pH có độ chính xác hiệu chỉnh là 0,1 đơn vị pH ở 25°C.
- 4.1.12. Máy li tâm 3.000- 15.000 vòng/ phút.
- 4.1.13. Kính hiển vi có vật kính dầu.
- 4.1.14. Cối chà sứ cỡ trung bình.
- 4.1.15. Máy xay nghiền 10.000 vòng/ phút trở lên.
- 4.1.16. Dao mổ, kéo cắt, pince kim loại.
- 4.1.17. Que cấy có vòng tròn ở đầu đường kính khoảng 3 mm và que cấy thẳng.
- 4.1.18. Khay men.
- 4.1.19. Đèn cồn.
- 4.1.20. Phễu lọc Seitz, Sephadex G 25.

4.2. Dụng cụ thủy tinh.

- 4.2.1. Bình tam giác và bình cầu đáy bằng 150, 200, 250 và 500 ml.
- 4.2.2. Cốc đong hình trụ 20, 50, 100, 500 ml.
- 4.2.3. Pipét có khắc độ 1,5 và 10 ml.
- 4.2.4. Ống nghiệm 18 x 160 mm.
- 4.2.5. Đĩa petri đường kính 150 mm, chiều cao 15mm, mặt đĩa phẳng và song song với đáy.
- 4.2.6. Phiến kính.

5. Môi trường, thuốc thử và kháng huyết thanh.

- 5.1. Phải dùng các hoá chất tinh khiết phân tích. Nên sử dụng những thành phẩm cơ bản hoặc đã chế sẵn; khi dùng phải tuân theo chỉ dẫn của nơi sản xuất. Môi trường, thuốc thử phải bảo quản ở nơi tối, nhiệt độ 4°C, không quá 1 tháng. Định kỳ kiểm tra lại môi trường, thuốc thử bằng các giống vi khuẩn tiêu chuẩn.
- 5.2. Môi trường và thuốc thử (phụ lục B).
 - 5.2.1. Môi trường tetratonat (Muller - Kauffman).
 - 5.2.2. Môi trường Salmonella - Shigella (S.S).
 - 5.2.3. Môi trường thạch deoxycholatxitrat.
 - 5.2.4. Môi trường thạch sắt đường trisaccarit (TSI).
 - 5.2.5. Môi trường nước thịt.
 - 5.2.6. Môi trường thạch dinh dưỡng.
 - 5.2.7. Môi trường thạch urê (Christensen).
 - 5.2.8. Môi trường lysin decarboxylas.
 - 5.2.9. Môi trường nước pepton (thử phản ứng Indol).
 - 5.2.10. Môi trường nước pepton glucose (thử phản ứng V.P.).
 - 5.2.11. Thuốc thử B - Galactosidas (O.N.P.G.).
 - 5.2.12. Thuốc thử Indol (dung dịch Kowacs).
 - 5.2.13. Thuốc thử Voges - Proskauer (dung dịch Barritt).
 - 5.2.14. Nước muối đẳng trương.
 - 5.2.15. Kháng huyết thanh Salmonella đa giá, đơn giá, Vi và H.

6. Cách tiến hành.

- 6.1. ***Yêu cầu chung:*** Các dụng cụ, môi trường, thuốc thử, v.v... và thao tác phải vô khuẩn.
- 6.2. ***Chuẩn bị mẫu thử:*** Thịt lạnh đông phải giải đông tự nhiên ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi đạt 13 - 15°C; đồ hộp phải cọ rửa sạch vỏ ngoài, lau khô, ủ 37°C từ 5 - 7 ngày.
- 6.3. ***Làm phong phú vi khuẩn trong mẫu thử:*** Cân 25g (không lấy mỡ, lấy cả chất lỏng nếu có), nghiền trước trong cối sứ, nghiền nhuyễn tiếp trong máy xay thịt từ 2 - 3 phút với tốc độ 10.000 vòng/phút, vừa nghiền vừa bổ sung dần 225 ml môi trường tetratonat, ủ 43°C từ 20 - 24 giờ.
- 6.4. ***Giám định tính chất sinh hoá.***
 - 6.4.1. Lấy một vòng que cấy canh trùng tetratonat (6.3) rĩa lên mặt thạch SS. và thạch deoxycholatxitrat mỗi loại 2 đĩa, hoặc dùng một trong hai loại môi trường, còn loại thứ hai cơ sở xét nghiệm được tùy ý chọn như thạch Endo, Macconkey, E.M.B, Istrati, v.v..., úp sắp đĩa môi trường, ủ 37°C trong 24 giờ, đọc kết quả.
 Khuẩn lạc Salmonella hình tròn, đường kính từ 1-2 mm, rĩa gọn, mặt lồi, không mầu, bóng láng (dạng S). Làm đồ phiên nhuộm gram, giám định bằng kính hiển vi với vật kính dầu: Vi khuẩn gram âm, có hình dạng như mục 1.
 - 6.4.2. Chọn 5 khuẩn lạc điển hình, rĩa cấy 2 - 4 đĩa thạch, ủ 37°C từ 18 - 24 giờ để giám định tiếp.
 - 6.4.3. Trên đĩa môi trường thạch sắt đường trisaccarit (TSI): Dùng que cấy đầu thẳng, rĩa cấy vi khuẩn trên mặt thạch nghiêng sau đó cắm sâu xuống đáy theo đường thẳng đứng, ủ 37°C trong 24 giờ, đọc kết quả.

Salmonella thể hiện: Trên mặt thạch nghiêng có màu đỏ (không phân giải lactose và sucrose); thân và đáy có màu vàng, có bọt khí hoặc vết nứt (phân giải glucose, sinh hơi), có màu đen (H_2S).

- 6.4.4. Trên môi trường thạch urê (Christensen): Rìa cấy vi khuẩn trên mặt thạch nghiêng, ủ $37^{\circ}C$ trong 24 giờ, đọc kết quả.

Salmonella có phản ứng âm tính: không chuyển màu (dương tính: màu đỏ).

- 6.4.5. Trên môi trường lysin decarboxylas:

Cấy vi khuẩn xuống dưới bề mặt môi trường hoặc sau khi cấy vi khuẩn nhỏ parafin lỏng vô khuẩn, dày khoảng 4 - 5 mm lên môi trường, ủ $37^{\circ}C$ trong 24 giờ, đọc kết quả. **Salmonella** có phản ứng dương tính: màu tím. (âm tính: màu vàng).

- 6.4.6. Thử B - Galactosidas (O.N.P.G):

Hoà tan một vòng que cấy khuẩn lạc từ môi trường T.S.I trong ống nghiệm có 0,25 ml nước muối đẳng trương vô khuẩn. Nhỏ 1 giọt toluen, lắc đều, ủ cách thủy $37^{\circ}C$ trong 15 phút; nhỏ tiếp 0,25 ml thuốc thử, lắc đều, tiếp tục ủ cách thủy $37^{\circ}C$ trong 24 giờ; đọc kết quả. **Salmonella** có phản ứng âm tính: không chuyển màu. (dương tính: màu vàng)

- 6.4.7. Thử phản ứng Indol:

Cấy vi khuẩn vào môi trường nước pepton, ủ $37^{\circ}C$ từ 24 - 48 giờ, sau nhỏ 1 ml thuốc thử, đọc kết quả. **Salmonella** có phản ứng âm tính: màu vàng nhạt (dương tính: màu đỏ).

- 6.4.8. Thử phản ứng Voges- Proskauer:

Cấy vi khuẩn vào môi trường nước pepton glucos, ủ $37^{\circ}C$ trong 48 giờ, chuyển 1 ml canh trùng sang một ống nghiệm khác, rồi nhỏ 0,6 ml dung dịch cồn α -naptol, 0,2ml dung dịch 40% Kalihydroxyt, lắc đều, đọc kết quả sau 5 - 15 phút. **Salmonella** có phản ứng âm tính: không màu hoặc vàng nhạt (dương tính: màu đỏ).

- 6.4.9. Nhận định tính sinh hoá đặc hiệu:

Tính chất sinh hoá	Dương hoặc âm tính	Tỷ lệ % với vi khuẩn <i>Salmonella</i>
TSI lactos	-	99,2
TSI sucros	-	99,5
TSI glucos	+	100
TSI glucos sinh hơi	+	91,2
TSI hydro-sulfua	+	91,6
Phân giải urê	-	100,0
Lysin decarboxylas	+	94,6
B- Galactosidas (O.N.P.G)	-	98,5
Phản ứng V.P	-	100,0
Phản ứng Indol	-	98,2

6.5. Giám định huyết thanh học bằng phản ứng ngưng kết trên phiến kính

- 6.5.1. Loại bỏ những vi khuẩn tự ngưng kết (6.4.2) bằng phương pháp nhỏ 1 giọt nước muối đẳng trương lên phiến kính dùng que cấy lấy một lượng vi khuẩn vừa đủ trộn đều thành huyền dịch, đọc kết quả.

Nếu có những hạt ngưng kết thì loại bỏ, nếu huyền dịch vẫn đục đều thì tiến hành giám định.

6.5.2. Với kháng huyết thanh O đa giá. Phương pháp làm theo 6.5.1. chỉ khác là dùng kháng huyết thanh O đa giá thay cho nước muối.

Nếu là Salmonella thì xuất hiện những hạt ngưng kết, tùy theo mức độ ngưng kết nhiều hay ít, hạt ngưng kết to hay nhỏ, nước đục hay trong mà đánh giá từ một đến bốn cộng. Huyền dịch vẫn đục đều là âm tính.

6.5.3. Khi dương tính với O đa giá thì làm ngưng kết tiếp với O đơn giá và H.

Với kháng huyết thanh O đơn giá. Phương pháp làm và đọc kết quả theo 6.5.2. Chỉ khác là dùng kháng huyết thanh O đơn giá thay cho O đa giá.

Với kháng huyết thanh H: Cấy chuyển vi khuẩn vào môi trường nước thịt, ủ 37°C từ 24 -48 giờ, lấy ra ly tâm 3.000 vòng/phút, trong 5 phút, chất lấy cặn. Phương pháp làm và đọc kết quả theo 6.5.2, chỉ khác là dùng kháng huyết thanh H thay cho O đa giá.

6.5.4. Trường hợp âm tính với kháng huyết thanh O đa giá thì thử làm ngưng kết với kháng huyết thanh Vi. Nếu có phản ứng dương tính thì cấy chuyển vi khuẩn vào 2 ống môi trường thạch nghiêng và 2 ống môi trường nước thịt, ủ 37°C từ 24 - 48 giờ.

6.5.4.1. Dùng nước muối đẳng trương thu hoạch vi khuẩn trên mặt thạch nghiêng, đun sôi cách thủy 20 phút để làm lại phản ứng ngưng kết với kháng huyết thanh O. Phương pháp làm và đọc kết quả theo 6.5.2. và 6.5.3.

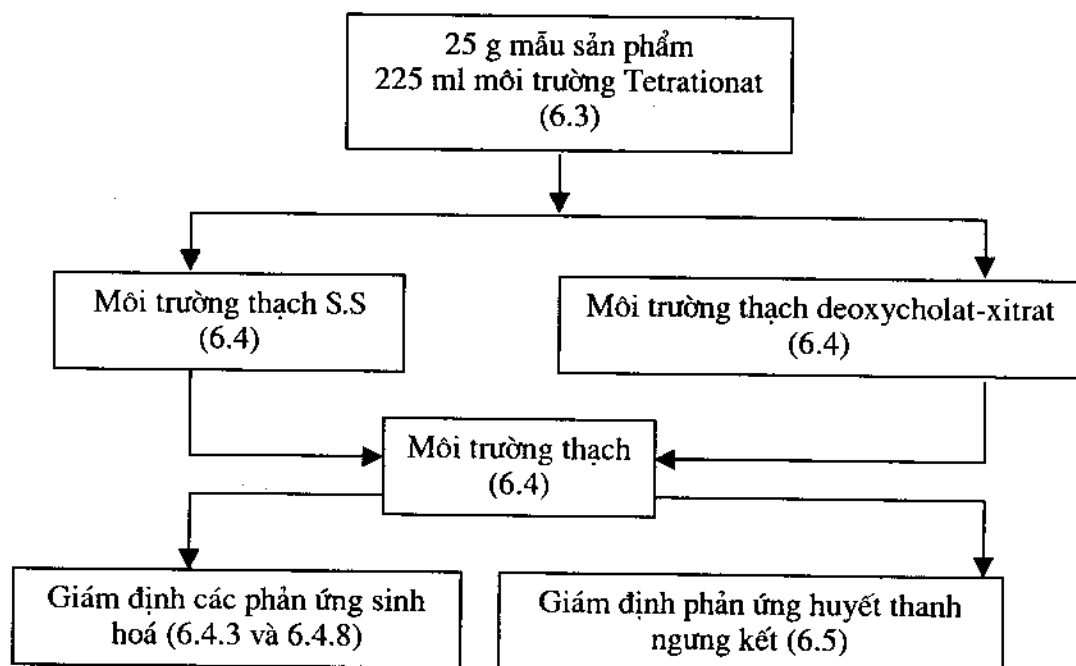
6.5.4.2. Ly tâm canh khuẩn (môi trường nước thịt) chất lấy cặn để làm phản ứng với kháng huyết thanh H. Phương pháp làm và đọc kết quả theo 6.5.3.

7. Tính toán kết quả

7.1. Căn cứ vào kết quả giám định tính chất sinh hoá.

7.2. Căn cứ vào kết quả giám định huyết thanh để định nhóm và sero-typ.

PHỤ LỤC A PHÁC ĐỒ KIỂM NGHIỆM



PHỤ LỤC B

PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG, THUỐC THỬ VÀ THUỐC NHUỘM

B1. Môi trường Tetratonat (Muller-Kauffman)

B1.1. Môi trường cơ bản:

- Nước thịt bò	1.000 ml
- Pepton	10 g
- Natri clorua	5 g
- Canxi cacbonat	45 g

Đun sôi nước thịt, hoà tan các thành phần còn lại. Hấp 121°C trong 20 phút.

Chú thích: Có thể thay nước thịt bò bằng 5g bột cao thịt hoà tan trong 1.000 ml nước cất.

B1.2. Dung dịch Natri-thiosulfat:

- Natri-thiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	50 g
- Nước cất	100 ml

Hoà tan. Hấp 121°C trong 20 phút.

B1.3. Dung dịch Iod:

- Iod	20 g
- Kali iodua (KI)	25 g
- Nước cất	10 ml

Hoà tan trước Kali iodua trong 5 ml nước; rồi cho iod vào, tiếp tục lắc mạnh cho tan rồi cho thêm phần nước còn lại. Bảo quản trong lọ mẫu nút kín

B1.4. Dung dịch lục sáng (Brillant green):

- Lục sáng	0,5 g
- Nước cất	100 ml

Chú thích: Có thể thay dung dịch lục sáng bằng đỏ phenol, dung dịch 0,2% trong nước (phenol red)

B1.5. Dung dịch mật bò:

- Mật bò khô	10 g
- Nước cất	100 ml

Hoà tan mật bò trong nước sôi. Hấp 121°C trong 20 phút.

B1.6. Môi trường hoàn chỉnh:

- Môi trường cơ bản (B1.1)	900 ml
- Dung dịch Natri-thiosulfat (B1.2)	28 ml
- Dung dịch Iod (B1.3)	20 ml
- Dung dịch lục sáng (B1.4)	2 ml
- Dung dịch mật bò (B1.5)	50 ml

Lần lượt hoà lẫn các dung dịch theo thứ tự từ trên xuống, chia môi trường vào các ống với dung tích thích hợp cho kiểm nghiệm.

B2. Môi trường thạch S.S

- Pepton	5 g
- Lactos	10 g
- Muối mật	10 g
- Natri-xitrat	12 g
- Natri-thiosulfat	12 g
- Sắt xitrat	0,5 g
- Bột cao thịt	5 g
- Thạch	18-20 g
- Đỏ trung tính, dung dịch 0,5% trong nước (neutral red)	4,5 ml
- Lục sáng, dung dịch 0,1% trong nước (brillant green)	0,33 ml
- Nước cất	1.000 ml

Trừ dung dịch đỏ trung tính và lục sáng ra, lần lượt hoà tan các thành phần còn lại trong nước sôi. Để nguội, chỉnh pH 7,2 - 7,4 hoà lần dung dịch đỏ trung tính và lục sáng vào. Đun sôi, để nguội xuống còn 55°C. Chia vào các đĩa petri vô khuẩn, mỗi đĩa từ 15-20 ml

B3. Môi trường thạch deoxycholat-xitrat:

- Bột cao thịt	5 g
- Pepton	5 g
- Thạch	18-20 g
- Natri deoxycholat	5g
- Natri- xitrat:	
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$	25 g
hoặc $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20 g
- Sắt xitrat	1 g
- Lactos	10 g
- Đỏ trung tính, dung dịch 1% trong cồn (neutral red)	2 ml
- Nước cất	1.000 ml

Hoà tan cao thịt, pepton, thạch trong 1.000 ml nước cất, đun sôi. Chỉnh pH 7,4 lần lượt hoà tan các thành phần còn lại, chỉnh pH 7,4. Đun sôi cách thuỷ hoặc hấp cách thuỷ từ 20-30 phút. Chia ra các đĩa petri, mỗi đĩa từ 15-20 ml

B4. Môi trường thạch sắt, đường trisaccarit:

- Pepton	20 g
- Natri clorua	5 g
- Lactos	10 g
- Saccaros	10 g
- Glucos	1 g
- Sắt xitrat	0,3 g

- Natri-thiosulfat	0,3g
- Đỏ phenol	0,025g
- Thạch	18-20 g
- Nước cất	1.000 ml

Lần lượt hoà tan các thành phần trên trong nước sôi chỉnh pH 7,4 chia vào các ống nghiệm, mỗi ống 10 ml. Hấp 121°C từ 10-15 phút. Đặt ống nghiệm nằm nghiêng để thân môi trường có chiều cao 2,5 cm

B5. Môi trường nước thịt:

- Nước thịt bò	1.000 ml
- Pepton	10 g
- Natri clorua	5 g

Hoà tan pepton, muối trong nước thịt đun sôi. Để nguội, chỉnh pH 7,4-7,6. Chia vào các ống nghiệm, mỗi ống 5 ml. Hấp 121 °C trong 20 phút

B6. Môi trường thạch dinh dưỡng:

- Môi trường nước thịt (B5)	1.000 ml
- Thạch	18-20 g

Hoà tan thạch vào môi trường nước thịt, đun sôi. Để nguội, chỉnh pH 7,4-7,6. Hấp 121°C trong 20 phút. Chia vào các đĩa petri mỗi đĩa 15-20 ml và vào các ống nghiệm, mỗi ống 5 ml. Đặt ống nghiệm nằm nghiêng

B7. Môi trường thạch urê (Christensen):

B7.1. Dung dịch cơ bản:

- Pepton	1 g
- Glucos	1 g
- Natri clorua	5 g
- Kali dihydro photphat	2 g
- Đỏ phenol	0,012 g
- Thạch	18-20 g
- Nước cất	1.000 ml

Hoà tan các thành phần trên trong nước cất đun sôi. Chỉnh pH 7,0. Hấp 121°C trong 20 phút.

B7.2. Dung dịch urê:

- Urê	400 g
- Nước cất vừa đủ	1.000 ml

Hoà tan urê trong nước. Lọc vô khuẩn

B7.3. Môi trường hoàn chỉnh:

- Dung dịch cơ bản (B7.1)	950 ml
- Dung dịch urê (B7.2)	50 ml

Trong điều kiện vô khuẩn, đun nóng dung dịch cơ bản, để nguội xuống còn 45 °C trộn dung dịch urê vào. Chia ra các ống nghiệm vô khuẩn, mỗi ống 5 ml, đặt ống nghiệm nằm nghiêng cho đông lại.

B8. Môi trường lysin decarboxylas:

- L. Lysin monohydro clorit	5 g
- Chất chiết men (yeast extract)	3 g
- Glucos	1 g
- Tím bromocresol	0,015 g
- Nước cất	1.000 ml

Hoà tan các thành phần trên trong nước cất đun sôi. Chỉnh pH 7,0. Chia vào các ống nghiệm có đường kính 8 mm, mỗi ống 5 ml. Hấp 121°C trong 10 phút

B9. Môi trường nước pepton (để thử phản ứng Indol)

- Pepton	10 g
- Natri clorua	5 g
- Nước cất	1.000 ml

Hoà tan các thành phần trên trong nước nóng, chỉnh pH 7,4 - 7,6. Chia vào các ống nghiệm, mỗi ống 5 ml. Hấp 121°C trong 20 phút.

B10. Môi trường nước pepton glucos (để thử phản ứng V.P.)

- Pepton	10 g
- Natri clorua	5 g
- Glucos	5 g
- Kalihydro photphat (K_2HPO_4)	5 g
- Nước cất	1.000 ml

Hoà tan các thành phần trên trong nước nóng, chỉnh pH 7,4 - 7,6 chia vào ống nghiệm, mỗi ống 3 ml. Hấp 121°C trong 20 phút.

B11. Thuốc thử B. Galactosidas (O.N.P.G.):

B11.1. Dung dịch đệm:

- Natri dihydro photphat (NaH_2PO_4)	6,9 g
- Natri hydroxyt, dung dịch 0,1 N trong nước (NaOH) khoảng	3 ml
- Nước cất vừa đủ	50 ml

Hoà tan Natri dihydro photphat trong khoảng 45 ml nước. Chỉnh pH 7,0 bằng Natri hydroxyt, dung dịch 0,1 N. Bổ sung nước vừa đủ 50 ml. Bảo quản lạnh.

B11.2. Dung dịch O.N.P.G.

- O-Nitrophenyl - B.D. Galactopyranosid (O.N.P.G.)	80 mg
- Nước cất 37°C	15 ml

Hoà tan trong nước, để nguội

B11.3. Thuốc thử hoàn chỉnh:

- Dung dịch đệm (B11.1)	5 ml
-------------------------	------

- Dung dịch O.N.P.G. (B11.2) 15 ml

Hoà lẫn, bảo quản lạnh, trước khi dùng đun nóng cách thuỷ 37°C

B12. Thuốc thử Indol (dung dịch Kowacs):

- Paradithylaminobenjaldehyd 5 g

- Cồn amyl hoặc iso-amyl 75 g

- Axitclohydric tinh khiết 25 g

Hoà tan aldehyd trong cồn, nhỏ từng giọt axit vào, vừa nhỏ vừa lắc cho tan đều.

B13. Thuốc thử Voges- proskauer (dung dịch Barritt);

- Dung dịch 5% cồn α - naphthol

+ α - naphthol 5 g

+ Cồn etanol 100 ml

- Dung dịch 40% Kalihydroxyt

+ Kalihydroxyt (KOH) 40 g

+ Nước cất 100 ml

B14. Nước muối đẳng trương:

- Natri clorua 8,5 g

- Nước cất 1.000 ml

Hoà tan muối, hấp 121°C trong 20 phút.

THỊT VÀ SẢN PHẨM CỦA THỊT

Phương pháp phát hiện *Bacillus Anthracis*

Meat and meat products - Detection of Bacillus Anthracis

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện *Bacillus Anthracis* trong thịt và sản phẩm của thịt dùng làm thực phẩm cho người, thức ăn gia súc và các sản phẩm động vật khác nhau như da, xương, sừng, lông; đất, nước, rơm, cỏ dùng trong chăn nuôi.

1. Đặc tính chung

Vi khuẩn hình gậy, to, gram dương, kích thước 1-1,5 x 5-10 micromet, có giáp mô, không di động, hai đầu vuông góc, đứng riêng lẻ, ghép đôi hoặc thành chuỗi ngắn từ 3-6 vi khuẩn. Sau khi tiếp xúc với không khí hoặc nuôi cấy lâu ngày trong môi trường thì hình thành nha bào, tồn tại rất lâu trong thiên nhiên. Vi khuẩn có những đặc tính riêng được quy định kiểm nghiệm trong tiêu chuẩn này.

2. Nguyên tắc

Căn cứ vào hình dạng vi khuẩn và khuẩn lạc; vào độc tính và phản ứng lắng cặn (Ascoli test) để xác định.

3. Lấy mẫu

- 3.1. Theo quy định thú y, cấm giết mổ gia súc có bệnh nhiệt thán, khi giết mổ nếu phát hiện bệnh hoặc nghi là bệnh thì ngừng ngay việc giết mổ, lấy mẫu xét nghiệm và thi hành những biện pháp phòng chống lây lan
- 3.2. Lấy mẫu kiểm tra thường quy định, định kỳ - theo quy định mục 3 TCVN 5153-90 ghi bệnh khi chưa mổ; cắt một bên tai (phía giáp mặt đất), lợn lấy hạch dưới hàm; đã mổ: lấy gan, lách, hạch.
- 3.3. Da, xương, sừng, lông động vật - Xuất phát từ vùng an toàn dịch bệnh: lấy mẫu theo quy định ở mục 3 TCVN 5153-90 không rõ nguồn gốc: lấy mẫu kiểm tra từng tấm da (50cm²/1 tấm). Xương, sừng, lông chia thành những lô nhỏ; lông không quá 50 kg; xương, sừng không quá 100 kg; lượng mẫu lấy bằng 0,1-0,2% trọng lượng lô hàng.
- 3.4. Đất, rơm, cỏ - 1 kg ở các vị trí khác nhau, nước 1.000 ml ở lớp trên mặt, giữa và dưới đáy.
- 3.5. Lấy, bảo quản và chuyển mẫu thử đi xét nghiệm phải bảo đảm tuyệt đối an toàn, không gây ô nhiễm ra ngoài.

Mẫu thử là sản phẩm mềm còn tươi sống phải đựng trong hộp (lọ) thủy tinh, chất dẻo, kim loại không gỉ, có nắp đậy kín, để trong phích (thùng) lạnh có đá vụn và chuyển nhanh về cơ quan kiểm dịch trong vòng 24 - 48 giờ.

Ban hành theo quyết định số 736/QĐ ngày 31 tháng 12 năm 1990 của ủy ban Khoa học Nhà nước

Các mẫu thử khác đựng trong túi polyetylen (PE) kín, bảo đảm độ bền và an toàn dịch bệnh.

- 3.6. Một nửa mẫu thử để kiểm nghiệm, phần còn lại để lưu

Thời gian lưu mẫu không quá 1 tháng

Chú thích: Cơ quan kiểm dịch chỉ nhận mẫu thử theo đúng quy định trên, kèm theo bản khai báo tình hình dịch bệnh trong đàn, trong vùng nếu có.

4. **Thiết bị và dụng cụ:** Theo TCVN 5153-90

5. **Môi trường, kháng huyết thanh, thuốc nhuộm**

(Phụ lục C)

- 5.1. Phải dùng các loại hoá chất tinh khiết phân tích. Nên sử dụng những thành phẩm cơ bản hoặc đã chế sẵn; khi dùng phải tuân theo chỉ dẫn của nơi sản xuất. Môi trường phải bảo quản ở nơi tối, nhiệt độ 4°C, không quá 1 tháng. Định kỳ kiểm tra lại hiệu lực bằng giống vi khuẩn tiêu chuẩn.

- 5.2. Môi trường nước thịt.

- 5.3. Môi trường thạch dinh dưỡng.

- 5.4. Môi trường thạch máu.

- 5.5. Huyết thanh lắng cặn và các loại kháng nguyên âm tính, dương tính tiêu chuẩn.

- 5.6. Nước muối đẳng trương.

- 5.7. Thuốc nhuộm gram.

- 5.8. Thuốc nhuộm Wright.

- 5.9. Thuốc nhuộm giáp mô (Rabiger).

6. **Cách tiến hành**

- 6.1. **Yêu cầu chung:** Các dụng cụ, môi trường, thao tác phải vô khuẩn, bảo đảm an toàn, không gây ô nhiễm.

- 6.2. **Giám định hình dạng vi khuẩn trong mẫu thử tươi sống;** chọn những chỗ có bệnh tích làm đồ hiến (từ 3 hiến kính trở lên), nhuộm gram, Wright và giáp mô. Giám định bằng kính hiển vi có vật kính dầu.

Bacillus Anthracis hình gậy, to, gram dương, hai đầu vuông góc, có giáp mô, đứng riêng lẻ, thành đôi hoặc chuỗi ngắn 3-6 vi khuẩn.

- 6.3. **Giám định sinh trưởng của vi khuẩn**

- 6.3.1. Chuẩn bị mẫu thử

- 6.3.1.1. Sản phẩm tươi sống: Bỏ đôi hạch lợn, còn các mẫu thử khác thì dùng dao mổ bistouri đã hơi nóng trên ngọn lửa, áp nhanh lên mặt (chỗ có bệnh tích), trong phạm vi đã tiêu độc trích sâu mũi dao, dùng que cấy lấy mẫu.

- 6.3.1.2. Sản phẩm khô cứng: Cân 5-10 g mẫu thử, cắt hoặc nghiền vụn thành mảnh, hạt nhỏ, ngâm trong 5-10 phần nước muối đẳng trương vô khuẩn, để ở nhiệt độ trong phòng từ 4-5 giờ và cứ sau 30 phút lắc nhẹ 2-3 phút. Thu lớp nước trong. Nếu nghi có nhiễm tạp khuẩn thì đun nóng cách thuỷ huyết dịch 65°C từ 15-30 phút.

Chú thích: Có thể dùng que tăm bông ướt vô khuẩn quét trên mặt mẫu thử (ở các vị trí khác nhau và cả 2 mặt) rồi chuyển tăm bông vào bình đã đựng sẵn 20-50 ml môi trường nước thịt, ủ 37°C trong 24 giờ.

- 6.3.1.3. Đất, rơm, cỏ. Theo 6.3.1.2.

6.3.1.4. Nước: Đong 500 ml, ly tâm 30.000 vòng/ phút trong 1 giờ. Thu lớp nước trên mặt và cặn dưới đáy (khoảng 5 ml). Nếu nghi có nhiễm tạp khuẩn thì đun nóng cách thủy 65°C từ 15-30 phút.

6.3.2. Ria cấy trên môi trường thạch máu, thạch dinh dưỡng, mỗi loại 2 đĩa, ủ 37°C trong 24 giờ, đọc kết quả và làm đồ phiến nhuộm gram, Wright.

Khuẩn lạc *Bacillus Anthracis* tròn, to, màu trắng đục, ướt nhầy, rìa mép nhăn nheo. Qua kính lúp thấy hình sóng, chung quanh có nếp soăn như làn tóc uốn, không tan máu. Trên lam kính vi khuẩn có nha bào hình bầu dục ở giữa thân.

6.3.3. Chọn những khuẩn lạc điển hình (6.3.2) cấy chuyển sang môi trường nước thịt, ủ 37°C từ 18 - 24 giờ; đọc kết quả và làm đồ phiến nhuộm gram, Wright kiểm tra thuần khiết. Trong nước có những sợi xốp như bông màu trắng đục, sau lắng xuống đáy ống, phần nước trên trong. Nếu có lẫn tạp khuẩn cần ria cấy lại trên môi trường thạch.

6.4. Giám định độc tính của vi khuẩn: Mỗi mẫu thử dùng 2 chuột nhắt trắng, nặng từ 18-20 g. Tiêm dưới da bụng cho mỗi chuột 0,1 ml canh khuẩn (6.3.3).

Thường sau 12-24 giờ chuột có triệu chứng ủ rũ, lưng cồng, lông sù, chết sau 24-96 giờ, bệnh tích xuất dưới da và thủy thũng ở vùng tiêm, lách sưng. Nếu cần giám định lại hình dạng vi khuẩn (6.2), đặc tính sinh trưởng (6.3) và thử phản ứng lắng cặn (Ascoli test).

Chú thích:

- 1) Có thể dùng huyền dịch mẫu thử (1:5-1:10) với liều tiêm gấp đôi thay cho canh trùng.
- 2) Nếu mẫu thử nghi nhiễm tạp khuẩn thì dùng phương pháp khía da chuột, sát mẫu thử hoặc canh khuẩn lên chỗ xây sát thay cho tiêm dưới da.
- 3) Những lô chuột chết do tiêm mẫu thử: Đất, nước, rơm, cỏ cần thử phản ứng lắng cặn (Ascoli test).

6.5. Thử phản ứng lắng cặn (Ascoli test)

6.5.1. Chuẩn bị mẫu thử (chế kháng nguyên)

6.5.1.1. Sản phẩm tươi sống: Cân 5-10 g nghiền nát trong cối sứ, pha loãng bằng nước muối đẳng trương thành huyền dịch 1:5-1:10. Đun sôi cách thủy từ 15-30 phút. Lọc qua giấy lọc cho trong.

6.5.1.2. Sản phẩm khô cứng: Cân 5-10 g xương, sừng, lông hoặc 15-25 cm² da, hấp 102°C từ 30-60 phút; để nguội cắt nhỏ hoặc nghiền vụn, hoà trộn trong 5-10 phần nước muối đẳng trương. Đun sôi cách thủy từ 15-30 phút. Lọc qua giấy lọc cho trong.

6.5.2. Trong ống nghiệm cỡ nhỏ hoặc ống nghiệm chuyên dụng đã chứa sẵn 0,5 ml huyết thanh lắng cặn; dùng pipet pasteur hút 0,5 ml kháng nguyên (6.5.1), nhỏ từ từ theo thành ống để kháng nguyên không bị hòa tan trong huyết thanh, có đường ranh giới rõ rệt; kèm theo 2 ống đối chứng dương tính và âm tính cho mỗi đợt kiểm nghiệm.

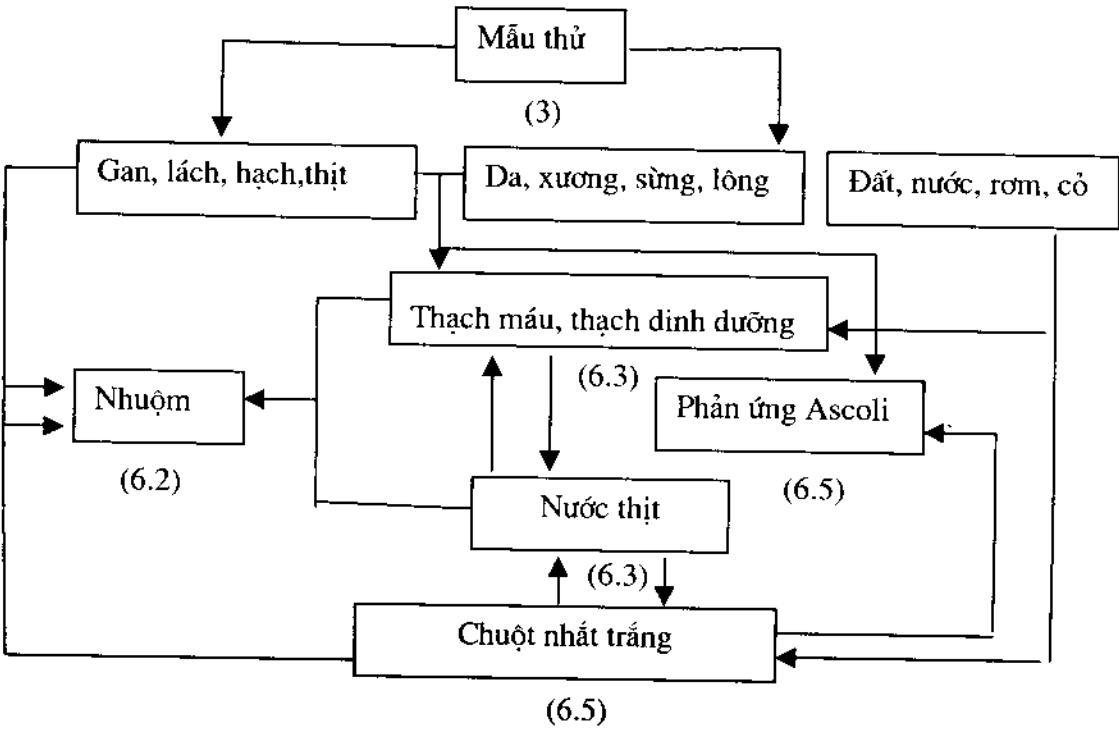
Đọc kết quả sau 1-15 phút. Nếu đường ranh giới xuất hiện vòng trắng đục là dương tính.

7. Tính toán kết quả

7.1. Căn cứ vào các kết quả giám định ở mục 6.

7.2. Nếu chỉ thử phản ứng lắng cặn thì tùy theo kết quả mà trả lời phản ứng Ascoli âm tính hoặc dương tính.

PHỤ LỤC A
PHÁC ĐỒ KIỂM NGHIỆM



PHỤ LỤC B

PHÂN BIỆT NHIỆT THÁN VỚI MỘT SỐ VI KHUẨN HIẾU KHÍ CÓ NHA BÀO

Vi khuẩn	Di động	Giáp mô	Hình dạng vi khuẩn	Hình cong khuẩn lạc	Tan máu	Trong môi trường nước thịt	Phản ứng Ascoli
B. Anthracis	-	+	Trực trùng, 2 đầu vuông, xếp chuỗi dài	Xoăn như làn tóc uốn	-	Cặn xóp như sợi bông, nước trong	+
B. Anthracoides	+	-	Hai đầu lồi, đứng riêng lẻ hoặc thành chuỗi ngắn	Không xoăn	+	Đục đều hoặc có màng vi khuẩn	±
B. Subtilis	+	-	“	Nhân nheo, không xoăn	+	Nước trong, màng vi khuẩn dày	-
B. Mycoides	+	-	“	Giống rễ cây	-	“	-
B. Vulgaris	+	-	“	Nhân nheo, màu vàng đục	+	“	-
B. Mesentericus	+	-	“	“	+	Đục đều, không có màng vi khuẩn	-
B. Megatherium	+	-	“	Màu trắng đục, mặt mịn	+	“	-
B. Cereus	+	-	“	Như sáp ong	+	Đục đều, có màng vi khuẩn	-

PHỤ LỤC C
PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG, THUỐC NHUỘM

C1. Môi trường nước thịt:

- Nước thịt bò 1.000ml
- Pepton 10g
- Natri clorua 5g

Hoà tan pepton và Natri clorua trong nước thịt bò đun sôi. Để nguội chỉnh pH 7,4 - 7,6. Chia vào các ống nghiệm mỗi ống 5 ml. Hấp 121°C trong 20 phút.

Chú thích: Có thể dùng 5g bột cao thịt hoà tan trong 1.000 ml nước cất thay cho 1.000 ml nước thịt bò.

C2. Môi trường thạch dinh dưỡng

- Môi trường nước thịt (C1) 1.000 ml
- Thạch 18-20g

Hoà tan thạch vào môi trường nước thịt đun sôi. Để nguội chỉnh pH 7,4 - 7,6. Hấp 121°C trong 20 phút. Chia vào các đĩa petri, mỗi đĩa 15 - 20 ml và vào các ống nghiệm, mỗi ống 5 ml, để ống nghiệm nằm nghiêng.

C3. Môi trường thạch máu:

- Môi trường thạch dinh dưỡng (C2) 100 ml
- Máu thỏ hoặc máu cừu vô khuẩn (đã tách fibrin) 10 ml

Đun nóng cho tan môi trường thạch. Khi nhiệt độ xuống còn 45°C thì cho máu vào trộn đều, chia vào các đĩa petri vô khuẩn, mỗi đĩa 15-20 ml

C4. Nước muối đẳng trương

- Natri clorua 8,5g
- Nước cất 1.000 ml

Hòa tan Natri clorua. Hấp 121°C trong 20 phút.

C5. Thuốc nhuộm gram.

C5.1. Dung dịch kết tinh tím (crystal violet)

- Kết tinh tím (crystal violet) 2g
- Cồn 95° 20 ml

C5.2. Dung dịch ammonium oxalat.

- Ammonium oxalat ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,8 g
- Nước cất 80 ml.

Hoà lẫn 2 dung dịch trên (C5.1, C5.2). Sau 24 giờ, lọc qua giấy lọc.

C5.3. Dung dịch Iod:

- Iod 1g
- Kali iodua (KI) 2 g

- Nước cất 300 ml

Hòa tan Kali iodua trong 5 ml nước, sau cho Iode vào, lắc mạnh cho tan rồi bổ xung phần nước còn lại.

C5.4. Dung dịch tẩy màu: Cồn 95°

C5.5. Dung dịch safranin

- Safranin 0,25 g
- Cồn 95° 10 ml
- Nước cất 90 ml

Hòa tan safranin trong cồn, rồi cho nước cất vào, lắc đều.

C6. Thuốc nhuộm Wright

- Bột nhuộm Wright 0,1 g
- Glycerin lỏng thuần khiết 1 ml
- Methanol (CH_3OH) 60 ml

Nghiền nhuyễn bột Wright trong glycerin bằng cối sứ, sau cho cồn vào. Đựng trong lọ màu sau 1 tuần đem lọc qua giấy. Bảo quản ở nơi tối trong lọ màu nâu

C7. Thuốc nhuộm giáp mô (Rabiger)

C7.1. Dung dịch kết tinh tím- formalin:

- Kết tinh tím (Crystal violet) 10 g
- Formalin 100 ml

Hòa tan, sau 1 ngày lọc qua giấy

C7.2. Dung dịch fuchsin basic:

- Fuchsin basic 1 g
- Cồn 95° 9 ml
- Nước cất 90 ml

Hòa tan trước fuchsin basic trong cồn, sau dùng nước cất pha loãng

THỊT VÀ SẢN PHẨM CỦA THỊT

Phương pháp phát hiện và đếm số Escherichia Coli

Meat and meat products
Detection and enumeration of Escherichia Coli

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện và đếm số E. coli trong 1 g và trên 100 cm² thịt và sản phẩm của thịt dùng làm thực phẩm cho người và thức ăn cho gia súc.

1. Đặc tính chung

Vi khuẩn hình gậy, mập, ngắn, gram dương, kích thước 0,4-0,7 x 13 micrômét, không có nha bào, không có giáp mô.

Vi khuẩn có những đặc tính sinh hoá được quy định kiểm nghiệm trong tiêu chuẩn này.

2. Nguyên tắc

Căn cứ vào đặc tính sinh hoá để xác định vi khuẩn. Pha loãng mẫu thử ở các đậm độ khác nhau rồi cấy lên môi trường chọn lọc để đếm và tính số vi khuẩn.

3. Lấy mẫu: Theo TCVN 5153-90

4. Thiết bị và dụng cụ: Theo TCVN 5153-90

5. Môi trường, thuốc thử:

5.1. Phải dùng các loại hoá chất tinh khiết phân tích, nên sử dụng các thành phẩm cơ bản hoặc đã chế sẵn, khi dùng phải theo chỉ dẫn của nơi sản xuất. Môi trường thuốc thử phải bảo quản ở nơi tối, nhiệt độ 4°C không quá 1 tháng. Định kỳ kiểm tra lại môi trường, thuốc thử bằng giống vi khuẩn tiêu chuẩn.

5.2. Môi trường, thuốc thử (Phụ lục A)

5.2.1. Môi trường nước thịt

5.2.2. Môi trường thạch deoxycholat

5.2.3. Môi trường thạch Macconkey

5.2.4. Môi trường nước pepton (để thử phản ứng Indole)

5.2.5. Môi trường nước pepton glucose (để thử phản ứng đỏ methyl và Voges- Proskauer).

5.2.6. Môi trường thạch Simon xitrat.

5.2.7. Thuốc thử Indol (dung dịch Kowacs)

5.2.8. Thuốc thử đỏ methyl (M.R.)

5.2.9. Thuốc thử Voges - Proskauer (dung dịch Barritt)

6. Cách tiến hành

6.1. **Yêu cầu chung:** Các dụng cụ, môi trường, thuốc thử v.v... và thao tác phải vô khuẩn.

6.2. **Chuẩn bị mẫu thử:** Thịt lạnh đông phải giải đông tự nhiên ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi đạt 13-15°C, đồ hộp phải rửa sạch vỏ ngoài, ủ 37°C từ 5-7 ngày.

6.3. **Chế huyền phù ban đầu**

6.3.1. Để đếm số vi khuẩn trong 1 gam sản phẩm: Cân 100 -225 gam (không lấy mỡ, lấy cả chất lỏng nếu có) nghiền trước trong cối sứ, nghiền nhuyễn tiếp trong máy xay thịt từ 2-3 phút với vận tốc 10.000 vòng/ phút, vừa nghiền vừa bổ sung dần 9 phần môi trường nước thịt (10^{-1}).

6.3.2. Để đếm số vi khuẩn trên 100 cm² sản phẩm: Dùng những miếng giấy thấm vô khuẩn, có kích thước 5 x 5 cm đã được làm ẩm ướt bằng nước muối đẳng trương rồi dán lên bề mặt sản phẩm ở các vị trí khác nhau từ 4-8 miếng (100-200 cm²). Sau 2 phút chuyển toàn bộ số giấy thấm vào bình đã đựng sẵn 10-20 ml môi trường nước thịt và 10-15 viên bi thủy tinh. Lắc cho tan giấy tùy theo khối lượng mẫu thử cần sử dụng mà pha loãng thành 1:1 (1 ml tương đương với 1m²)

6.4. **Đếm số vi khuẩn:** Từ huyền phù ban đầu (6.3) tiếp tục pha loãng 10 lần (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) tùy mức nhiễm khuẩn mà quyết định. Mỗi đậm độ cấy vào 2 đĩa môi trường thạch deoxycholat hoặc Macconkey một khối lượng bằng nhau trong khoảng từ 0,1-1 ml (tùy mức nhiễm khuẩn mà quyết định), dàn đều trên mặt thạch hoặc trộn đều trong thạch nóng lỏng ở 45°C, đặt sập đĩa môi trường, ủ 37°C. Đọc kết quả 2 lần vào 24 giờ và 48 giờ.

Khuẩn lạc E. coli to, đục, mặt khô, màu đỏ.

Căn cứ vào hình dạng, màu sắc mà đếm; chọn 5 khuẩn lạc để giám định tiếp tính chất sinh hoá và xác định tỷ lệ (phụ lục B).

6.5. **Thử các phản ứng IMViC.**

6.5.1. Phản ứng Indol: Phương pháp theo TCVN 5153-90

E. coli có phản ứng dương tính, lớp thuốc thử trên mặt môi trường có màu đỏ.

Chú thích: E. coli không điển hình (atypic) có phản ứng âm tính: màu vàng nhạt.

6.5.2. Phản ứng đỏ methyl (methyl red): Cấy vi khuẩn (6.4) vào môi trường nước pepton glucos, ủ 37°C từ 2-4 ngày, nhỏ 5 giọt thuốc thử đỏ methyl vào, đọc kết quả: E. coli có phản ứng dương tính: màu đỏ (âm tính: màu vàng)

6.5.3. Phản ứng Voges - proskauer: Phương pháp theo TCVN 5153-90

E. coli có phản ứng âm tính, không màu hoặc vàng nhạt (dương tính: màu đỏ)

6.5.4. Trên môi trường thạch Simon xitrat: Ria cấy vi khuẩn (6.4) trên mặt thạch nghiêng, ủ 37°C từ 1-3 ngày E. coli không sinh trưởng (-)

7. Tính toán kết quả

7.1. **Căn cứ vào kết quả giám định tính chất sinh hoá.**

7.2. **Căn cứ vào công thức dưới đây để tính số E. coli trong 1 gam hoặc trên 100 cm² sản phẩm**

$$X \text{ gam} = \text{số khuẩn lạc đếm được} \times \frac{1}{\text{khối lượng nuôi cấy}} \times \frac{1}{\text{bội số pha loãng mẫu thử}}$$

$$X \text{ 100gam} = 100 \times \text{số khuẩn lạc đếm được} \times \frac{1}{\text{khối lượng nuôi cấy}} \times \frac{1}{\text{bội số pha loãng}}$$

PHỤ LỤC A

MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY, THUỐC THỬ

A1. Môi trường nước thịt: Theo phụ lục B TCVN 5153-90

A2. Môi trường thạch deoxycholat:

- Pepton	10 g
- Thạch	18-20 g
- Natri deoxycholat	1 g
- Natri clorua	5 g
- Kali hydro phot phát (K_2HPO_4)	2 g
- Lactos	10 g
- Sắt xitrat	2 g
- Đỏ trung tính dung dịch 0,1% trong cồn (neutra- red)	33,3 ml
- Nước cất	1.000 ml

A3. Môi trường thạch macconkey:

- Pepton	20 g
- Thạch	18-20 g
- Natri clorua	5 g
- Lactos	10 g
- Muối mật	5 g
- Dung dịch cồn đỏ trung tính 0,1 %	5 ml
- Nước cất	1.000 ml

Hoà tan pepton, thạch trong nước đun sôi, chỉnh pH 7,5. Lần lượt hoà tan các thành phần còn lại (trừ đỏ trung tính). Lọc qua bông, chỉnh lại pH 7,5. Cho dung dịch đỏ trung tính vào, lắc mạnh cho tan đều. Hấp 115°C trong 20 phút, chia vào các đĩa petri mỗi đĩa 15-20 ml

A4. Môi trường nước pepton: Theo phụ lục B TCVN 5153-90

A5. Môi trường nước pepton - glucose: Theo phụ lục B TCVN 5153-90

A6. Môi trường thạch Simon - xitrat:

- Ammonium dihydrophotphat ($NH_4H_2PO_4$)	1 g
- Magiê - sulphat ($Mg\ SO_4$)	0,2 g
- Kali hydro photphat (K_2HPO_4)	1 g
- Natri xitrat ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)	2,3g
- Natri clorua ($NaCl$)	5 g
- Thạch	18-20 g
- Nước cất	1.000 ml
- Xanh Brôm-thy-môn, dung dịch 0,5 - 1% trong cồn (Bromthymol Blue):	10-20 ml

Theo thứ tự lần lượt hòa tan các muối trong nước, cho thạch vào và đun sôi, chỉnh pH 6,8 rồi cho tiếp dung dịch xanh brôm-thy-môn. Lắc đều và lọc qua bông. chia ra các ống nghiệm 10 x 100 mm, mỗi ống từ 3-5 ml. Hấp 121°C trong 20 phút. Để ống nằm nghiêng cho môi trường đông lại (môi trường có màu xanh).

A7. Thuốc thử Indol: Theo phụ lục B TCVN 5153-90

A8. Thuốc thử đỏ methyl (methyl red): Hoà tan 0,04 g đỏ methyl trong 60 ml cồn 95° sau cho thêm 40 ml nước cất.

A9. Thuốc thử Voges- Proskauer: Theo phụ lục B TCVN 5153-90

PHỤ LỤC B

KỸ THUẬT ĐẾM VÀ TÍNH SỐ VI KHUẨN (KHUẨN LẠC)

- B1. Đếm số bằng mắt thường hoặc kính lúp.** Tốt nhất là đếm toàn bộ số vi khuẩn có trên đĩa môi trường; nếu số vi khuẩn nhiều có thể chia đĩa petri thành các phần bằng nhau: 2, 4, 8, 16 rồi đếm số vi khuẩn trong 1 phần, sau nhân với 2, 4, 8, 16 phần tương ứng
- B2. Cách chọn đĩa môi trường để đếm**
- B2.1. Chọn những đĩa khuẩn lạc mọc riêng biệt, số lượng từ 30 - 300 vi khuẩn.
- B2.2. Nếu 2 đậm độ pha loãng kế tiếp nhau có cùng số đếm từ 30 - 300 thì lấy số đếm được ở từng đĩa nhân với bội số pha loãng, so sánh tỷ lệ giữa hai giá trị, nếu nhỏ hơn 2 thì lấy số đếm bình quân của cả 2 giá trị. Nếu lớn hơn 2 thì lấy số có giá trị thấp
- B2.3. Nếu các đậm độ pha loãng đều có số đếm trên 300 thì chọn đĩa môi trường có bội số pha loãng cao nhất.
- B2.4. Nếu các đậm độ pha loãng đều có số đếm ít hơn 30 thì chọn đĩa môi trường có bội số pha loãng thấp nhất.
- B3. Cách tính lại số lượng vi khuẩn:** Căn cứ vào kết quả giám định 5 khuẩn lạc đại diện cho mỗi nhóm để tính lại số đếm (B2). Nếu cả 5 đều dương tính thì nhóm đó được tính 100% dương tính, nếu có 3 dương tính thì chỉ được tính là 60% dương tính.
- B4. Cách tính số vi khuẩn trong 1 gam và trên 100 cm² mẫu thử theo công thức:**

$$X \text{ 1 gam} = \text{số khuẩn lạc đếm được} \times \frac{1}{\text{khối lượng mẫu thử}} \times \frac{1}{\text{bội số pha loãng mẫu thử}}$$

$$X \text{ 100 cm}^2 = 100 \times \text{số khuẩn lạc đếm được} \times \frac{1}{\text{khối lượng mẫu thử}} \times \frac{1}{\text{bội số pha loãng mẫu thử}}$$

- B4.1. Số khuẩn lạc đếm được là số lượng bình quân trên 2 đĩa môi trường có cùng độ đậm pha loãng hoặc ở 2 độ pha loãng kế tiếp nhau và đã được xác minh lại (B3).
- B4.2. Trước khi tính cần làm tròn số đếm: Dưới 10 thì làm tròn số hàng chục; dưới 5 thì lấy số tròn hàng chục dưới, trên 5 thì lấy tròn số hàng chục trên, trên 100 nếu số hàng đơn vị là 5 thì lấy số tròn chia chẵn cho 20, các trường hợp khác thì lấy số tròn chia chẵn cho 10.
- B4.3. Thí dụ và cách tính:
- B4.3.1. Thí dụ: 1 ml mẫu thử ở độ đậm pha loãng 10⁻² được cấy đều trên 2 đĩa môi trường. Đĩa 1 có 65 khuẩn lạc gồm 55 điển hình và 10 không điển hình. Đĩa 2 có 85 khuẩn lạc gồm 82 điển hình và 3 không điển hình.
- B4.3.2. Cách tính:
- Tổng số khuẩn lạc đếm được trên 2 đĩa 150 gồm 137 điển hình và 13 không điển hình.
 - Sau khi chọn và giám định lại 5 khuẩn lạc ở mỗi nhóm thì thấy (giả thiết) cả 5 khuẩn lạc ở nhóm điển hình đều dương tính, chiếm tỷ lệ 100% (5/5). Có 3 trong nhóm không điển hình dương tính chiếm tỷ lệ 60% (3/5).
 - Căn cứ vào tỷ lệ trên, số khuẩn lạc được tính lại như sau:

$$\begin{aligned}
 \text{Đĩa } 1 + 2 &= 137 + 13 \times 60\% \\
 &= 137 + 7,8 \\
 &= 137 + 8 \text{ (số tròn)} \\
 &= 145 \\
 &= 140 \text{ (làm số tròn)}
 \end{aligned}$$

$$\text{Số bình quân} = \frac{140}{2} = 70$$

$$X1g = 70 \times \frac{1}{1} \times \frac{1}{10^{-2}} = 70 \times 10^2 = 7 \times 10^3$$

- Nếu tính số vi khuẩn trên 100 cm² diện tích mẫu thử cũng tính như trên rồi nhân với 100.

THỊT VÀ SẢN PHẨM CỦA THỊT

Phương pháp phát hiện và đếm số *Staphylococcus aureus*

Meat and meat products

Detection and enumeration of Staphylococcus aureus

Trên cơ sở tiêu chuẩn TCVN 4830-89 hướng dẫn chung về *Staphylococcus aureus*. Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện và đếm số *Staphylococcus aureus* trong 1 gam thịt và trên 100 cm² thịt và các sản phẩm của thịt dùng làm thực phẩm cho người và thức ăn gia súc.

1. Đặc tính chung

Vi khuẩn hình tròn, gram dương, kích thước 0,5 x 1 micrô mét, không có giáp mô, không có nha bào, không di động, tụ thành chùm nho hoặc ghép đôi, hợp thành chuỗi ngắn. Sinh trưởng trong môi trường hiếm khí, yếm khí có 7,5% muối; phân giải đường glucose và mannit, đông vón huyết tương, tan hồng cầu, sắc tố màu vàng.

2. Nguyên tắc

Căn cứ vào đặc tính sinh hoá để xác định vi khuẩn. Pha loãng mẫu thử các đậm độ khác nhau, ria cấy trên môi trường chọn lọc để đếm và tính số vi khuẩn.

3. Lấy mẫu: Theo TCVN 5153-90.

4. Thiết bị và dụng cụ: Theo TCVN 5153-90.

5. Môi trường, huyết tương:

5.1. Phải dùng các loại hoá chất tinh khiết phân tích, nên sử dụng các thành phần cơ bản hoặc đã chế sẵn; khi dùng phải theo chỉ dẫn của nơi sản xuất. Môi trường phải bảo quản ở nơi tối, nhiệt độ 4°C, không quá 1 tháng. Định kỳ kiểm tra lại môi trường bằng giống vi khuẩn tiêu chuẩn.

5.2. Môi trường, huyết tương (phụ lục B)

5.2.1. Môi trường thạch telurit - glycin (môi trường thạch T.G).

5.2.2. Môi trường nước thịt.

5.2.3. Môi trường nước thịt B.H.I.

5.2.4. Môi trường Chapman.

5.2.5. Dung dịch chống máu đông.

5.2.6. Huyết tương. Khi cùng huyết tương đông khô phải theo đúng chỉ dẫn của nơi sản xuất. Nếu chế huyết tương thì lấy máu thả cho vào bình đựng sẵn dung dịch chống đông theo tỷ lệ 9 phần máu

một phần dung dịch ngăn máu đông; ly tâm 15-20 phút để hồng cầu lắng xuống đáy ống nghiệm, thu khối nước trong màu vàng nhạt (huyết tương).

Cũng như môi trường, trước khi dùng phải kiểm tra lại hiệu lực bằng chủng *Step. aureus* tiêu chuẩn.

6. Cách tiến hành

6.1. Yêu cầu chung: Các dụng cụ, môi trường, v.v... và thao tác phải vô khuẩn.

6.2. Chuẩn bị mẫu thử: Thịt lạnh đông phải giải đông tự nhiên ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi đạt 13 - 15°C, đồ hộp phải cọ rửa sạch vỏ ngoài, lau khô, ủ 37°C từ 5 - 7 ngày.

6.3. Chế huyền phù ban đầu

6.3.1. Đếm số vi khuẩn trong 1 gam sản phẩm: cân 100 - 225 gam (không lấy mỡ, lấy cả chất lỏng nếu có) nghiền trước trong cối sứ, nghiền nhuyễn tiếp trong máy xay thịt từ 2 - 3 phút với tốc độ 10.000 vòng/phút, vừa nghiền vừa bổ sung dần 9 phần môi trường nước thịt hoặc B.H.I (10^{-1})

6.3.2. Đếm số vi khuẩn trên 100 cm² sản phẩm: Dùng những miếng giấy thấm vô khuẩn có kích thước 5 x 5 cm đã được làm ướt bằng nước muối đẳng trương, rồi dán lên bề mặt sản phẩm ở các vị trí khác nhau từ 4 - 8 miếng (100 - 200 cm²). Sau 2 phút chuyển toàn bộ giấy thấm vào bình đã đựng sẵn 10 - 20 ml môi trường nước thịt hoặc nước thịt B.H.I. và 10 - 15 viên bi thủy tinh. Lắc cho tan giấy, tùy theo khối lượng mẫu thử cần sử dụng mà pha loãng thành 1:1 (1ml tương đương với 1 cm²).

6.4. Đếm số vi khuẩn: Từ huyền phù ban đầu 6.3 tiếp tục pha loãng 10 lần (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ...) (tùy mức nhiễm khuẩn mà quyết định). Mỗi đậm độ cấy vào 2 đĩa môi trường thạch Telurit - glycin một khối lượng bằng nhau trong khoảng từ 0,1 - 1 ml (tùy mức nhiễm khuẩn mà quyết định), dàn đều trên mặt thạch hoặc trộn đều trong thạch nóng lỏng ở 45°C, đặt úp đĩa môi trường, ủ 37°C từ 24 - 48 giờ, đọc kết quả.

Khuẩn lạc *Stap. aureus* tròn, mặt nhẵn, viền mép gọn, màu đen, có vòng bao quanh màu trắng đục, sau 48 giờ chuyển thành vòng trắng rộng khoảng 3 mm, còn các tụ cầu khuẩn khác màu xám nhạt.

Căn cứ vào hình dạng và màu sắc trên mà đếm. Nếu nghi ngờ thì phân thành 2 nhóm: điển hình và không điển hình; chọn trong mỗi nhóm 5 khuẩn lạc để giám định phản ứng đông vón huyết tương mà xác định tỷ lệ (theo phụ lục B, TCVN 5155-90).

6.5. Giám định tính chất sinh hoá:

6.5.1. Trên môi trường Chapman: Cấy (6.4) vào 2 đĩa môi trường, ủ 37°C trong 24 giờ, đọc kết quả.

Khuẩn lạc *Stap. aureus* tròn, hơi đục, mặt nhẵn, viền mép gọn, màu vàng.

6.5.2. Thử phản ứng đông vón trên phiến kính: Nhỏ 1 giọt nước muối lên phiến kính, dùng que cấy lấy vi khuẩn vừa đủ (6.4) trộn thành huyền dịch đục đều, nhỏ tiếp 1 giọt huyết tương vào và thêm thí nghiệm đối chứng âm tính (1 giọt nước muối và 1 giọt huyết tương). Đọc kết quả bằng kính lúp hoặc kính hiển vi.

6.5.3. Thử phản ứng đông vón trong ống nghiệm: Chỉ làm khi 6.5.2. âm tính. Cấy vi khuẩn ở 6.4. vào môi trường nước thịt B. H.I, ủ 37°C từ 20 - 24 giờ. Sau chuyển 0,1 ml canh khuẩn vào ống nghiệm cỡ 10 x 75 mm đã chứa sẵn 0,3 ml huyết tương pha loãng theo tỷ lệ 1 phần huyết tương, 3 phần nước. Làm thêm thí nghiệm đối chứng âm tính (0,1ml nước muối và 0,3 ml huyết tương pha loãng) trộn đều, ủ 37°C; đọc kết quả sau 2, 4, 6, 8 và 24 giờ.

Chú thích: Nếu dùng huyết tương đông khô thương phẩm thì theo hướng dẫn của nơi sản xuất

7. Tính toán kết quả

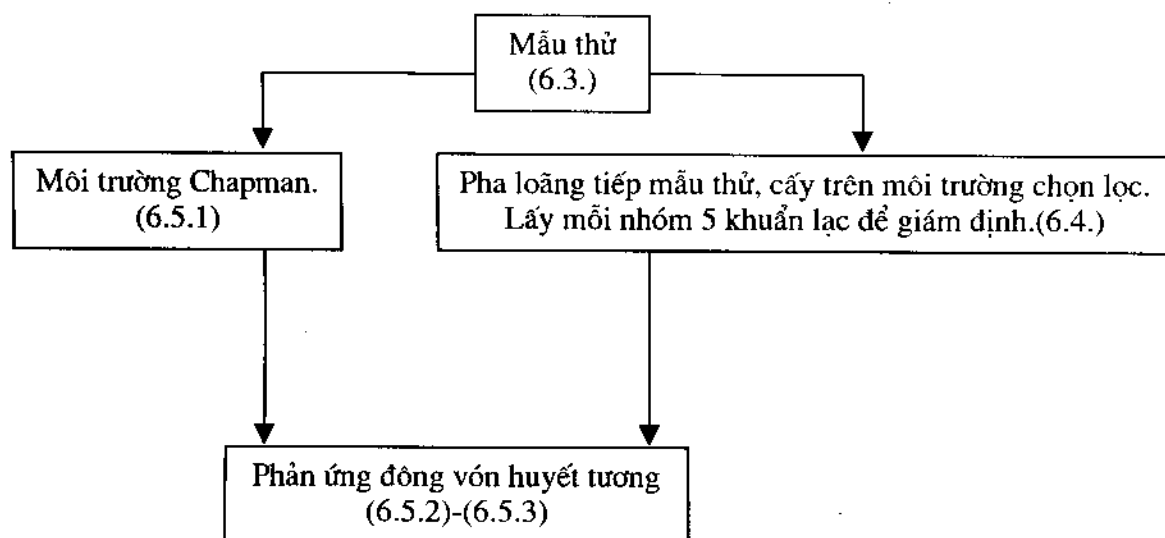
7.1. Căn cứ vào kết quả giám định tính chất sinh hoá

7.2. Căn cứ vào công thức dưới đây để tính số *Staphylococcus aureus* trong 1 gam hoặc trên 100 cm² sản phẩm (theo phụ lục B, TCVN 5155-90)

$$X \text{ gam} = \text{Số khuẩn lạc đếm được} \times \frac{1}{\text{Khối lượng nuôi cấy}} \times \frac{1}{\text{bội số pha loãng}}$$

$$X \text{ 100 cm}^2 = 100 \times \text{Số khuẩn lạc đếm được} \times \frac{1}{\text{Khối lượng nuôi cấy}} \times \frac{1}{\text{bội số pha loãng}}$$

**PHỤ LỤC A
PHÁC ĐỒ KIỂM NGHIỆM**



PHỤ LỤC B

PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG

B1. Môi trường thạch Telurit - glycin (thạch T.G.).

B1.1. Môi trường cơ bản:

- Trypton	10g
- Bột cao thịt	5g
- Chất triết men (yeast extract)	5g
- Glycin	12g
- Lithium clorua	5g
- Mannit	20g
- Thạch	18 - 20g
- Nước cất	1.000ml
- Nếu cần thì cho thêm dung dịch sulfamezatin	27,5ml

Hoà tan các thành phần trên trong nước sôi. Chính pH 7,4 - 7,6. Hấp 115°C trong 15 phút.

Chú thích

1/ Có thể thay 1000 ml nước cất và 5g bột cao thịt bằng 1000 ml nước thịt.

2/ Dung dịch Sulfamezatin (dùng khi mẫu thử nghi có vi khuẩn *Proteus*):

- Sulfamezatin	0,2g
- Natrihydroxyt, dung dịch 0,1N	10 ml
- Nước cất vừa đủ	100 ml

Hoà tan Sulfamezatin trong dung dịch Natrihydroxyt. Cho thêm nước cất vừa đủ 100 m.

B1.2. Dung dịch Telurit:

- Kali telurit	1g
- Nước cất	100ml

Hoà tan trong nước đun nóng. Lọc vô khuẩn. Bảo quản 0 - 4°C.

B1.3. Dung dịch Natri pyruvat:

- Natri pyruvat	20 g
- Nước cất	100 ml

Hoà tan trong nước đun nóng. Lọc vô khuẩn. Bảo quản 0 - 4°C.

B1.4. Môi trường hoàn chỉnh:

- Môi trường cơ bản (B1.1)	94 ml
- Dung dịch Telurit (B1.2)	1 ml
- Dung dịch pyruvat (B1.3)	5 ml

Bằng thao tác vô khuẩn, chia ra các đĩa petri, mỗi đĩa 15 - 20 ml.

B2. Môi trường nước thịt B.H.I.

- Pepton	10g
- Bột óc bẻ	12,5g
- Bột tim bẻ	5g
- Glucos	2g
- Natri clorua	5g
- Natrihydro photphat (Na_2HPO_4)	2,5g
- Nước cất	1000 ml

Hoà tan các thành phần trên trong nước sôi. Chỉnh pH 7,6. Chia vào các bình thuỷ tinh mỗi bình từ 10 - 20 ml. Hấp 121°C trong 20 phút.

B3. Môi trường nước thịt:

- Nước thịt bò	1000 ml
- Pepton	10g
- Natri clorua	5g

Hoà tan pepton và Natri clorua trong nước thịt, đun sôi. Để nguội, chỉnh pH 7,4 - 7,6. Chia vào các bình thuỷ tinh, mỗi bình từ 10 - 20 ml. Hấp 121°C trong 20 phút.

B4. Môi trường Chapman:

- Mannit	10g
- Bột cao thịt	1g
- Pepton	10g
- Natri clorua	75g
- Thạch	18 - 20 g
- Đỏ trung tính	0,025 g
- Nước cất	1000 ml

Hoà tan các thành phần trên trong nước đun sôi. Chỉnh pH 7,6. Hấp 121°C trong 15 phút. Chia vào các đĩa petri mỗi đĩa 15 - 20 ml.

B5. Dung dịch ngâm máu đông:

- Natri xitrat	7,8g
- Nước cất	100 ml

Hoà tan trong nước. Chia vào các lọ nhỏ từ 3 - 5 ml. Hấp 121°C trong 15 phút.

THỊT VÀ SẢN PHẨM CỦA THỊT

Phương pháp phát hiện vi rút dịch tả lợn

Meat and meat products
Detection of Swine fever virus

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện vi rút dịch tả lợn bằng kháng thể globulin dịch tả lợn gắn huỳnh quang iso- thyocyanat (conjugat kháng thể huỳnh quang).

1. Đặc tính chung

Vi rút dịch tả lợn gây bệnh cho lợn ở các lứa tuổi. Bệnh tiến triển nhanh dưới thể bại huyết, có thân nhiệt cao; triệu chứng và bệnh tích chính là xuất huyết, hoại tử và liệt thần kinh. Vi rút sinh trưởng được trên tế bào thận lợn, nhưng thường không gây được những biến đổi trên tế bào.

2. Nguyên tắc

Khi kháng nguyên dịch tả lợn gặp conjugat kháng thể huỳnh quang thì kết hợp thành phức hợp kháng nguyên- kháng thể huỳnh quang. Phức hợp này qua kính hiển vi huỳnh quang phát ra những đốm sáng mang màu sắc riêng biệt.

3. Lấy mẫu

3.1. Tiêu chuẩn này dùng để xác định bệnh dịch tả lợn cho một lô lợn

3.2. Lô lợn là số lượng lợn có cùng nơi xuất phát (trại, phường, xã) được vận chuyển về trong cùng thời gian, khi nhập về được nuôi ở khu riêng (cách ly tân đáo) không tiếp xúc với các môi giới truyền bệnh khác.

3.3. Mẫu thử là tuyến amygdal, lách, hạch lâm ba lợn vừa chết hoặc vừa giết mổ. Bằng thao tác vô khuẩn lấy và đựng mẫu vào hộp (bình, lọ) thủy tinh hoặc chất dẻo, có nắp đậy kín để trong phích lạnh, có chứa đá vụn trộn lẫn với muối ăn (NaCl) và chuyển nhanh về cơ quan kiểm dịch trong vòng 24-48 giờ.

3.4. Một nửa mẫu để kiểm nghiệm, phần còn lại để lưu. Mẫu lưu được bảo quản ở nhiệt độ tối thiểu 15°C không quá 1 tháng

Chú thích:

- a. Cơ quan kiểm dịch chỉ nhận mẫu thử theo đúng quy định trên (3.3.), kèm theo bản khai báo về lô lợn nghi bệnh (nguồn gốc, số lượng, trọng lượng, ngày nhập ngày phát bệnh, số lợn ốm, chết, triệu chứng, bệnh tích...)

- b. Để định bệnh được chính xác thì sau khi nhận được mẫu và báo cáo, cơ quan kiểm dịch phải cử ngay bác sỹ thú y đến nơi để xác minh tình hình dịch, kết hợp tình hình tại chỗ với kết quả phòng xét nghiệm và nếu cần được phép mời những cơ quan chuyên trách (trong và ngoài nước) để cùng định bệnh

4. Thiết bị và dụng cụ

4.1. Thiết bị

- 4.1.1. Phòng cấy vô khuẩn, trong có tủ cấy tay (thanh trùng phòng cấy và tủ sấy tay bằng đèn cực tím 1,5 -2,5 óát/m³ trong 3 giờ, sau phun phenol 5% hoặc xông fornol rồi phun phenol)
- 4.1.2. Tủ ẩm có điều chỉnh nhiệt độ ổn định 35-37-43 ± 1 °C
- 4.1.3. Tủ sấy khô
- 4.1.4. Tủ hấp ướt
- 4.1.5. Nồi cất nước 2 lần bằng thuỷ tinh
- 4.1.6. Tủ lạnh 0-4 °C
- 4.1.7. Tủ lạnh -35 °C
- 4.1.8. Bình chứa nitơ lỏng
- 4.1.9. Máy cất lạnh có bình khí CO₂
- 4.1.10. Nồi đun cách thuỷ có điều chỉnh nhiệt độ ổn định từ 35-56 °C
- 4.1.11. Ly tâm thông thường 5.000 vòng/ phút và ống ly tâm đáy nhọn
- 4.1.12. Máy xay thịt
- 4.1.13. Máy khuấy từ
- 4.1.14. Cân phân tích có độ chính xác không lớn hơn 0,01 g
- 4.1.15. Cân thiên bình (Roberval) cỡ nhỏ (50-100g)
- 4.1.16. Buồng đếm bạch huyết cầu
- 4.1.17. Kính hiển vi thường có thị kính x 10 x 15
- 4.1.18. Kính hiển vi huỳnh quang và các linh kiện
- 4.1.19. Máy đo pH có độ chính xác hiệu chỉnh là 0,1 đơn vị pH ở 25 °C
- 4.1.20. Phễu thuỷ tinh đường kính 3 cm
- 4.1.21. Phễu lọc vi khuẩn: Seitz, EKS2, Sephadex G2550
- 4.1.22. Dao bistouri, kéo, vải lọc pince các loại
- 4.1.23. Đèn cồn, bông, gạc, vải lọc.

4.2. Dụng cụ

- 4.2.1. Bình tam giác và bình cầu đáy bằng có dung tích 50, 150, 250 ml
- 4.2.2. Cốc đong có chân các cỡ
- 4.2.3. Bình đong hình trụ các cỡ
- 4.2.4. Pipet Pasteur và pipet có khắc độ 1,5-10 ml
- 4.2.5. Đĩa petri đường kính 150 mm, chiều cao 15 mm
- 4.2.6. Ống leighton nuôi cấy tế bào có kèm lá kính

4.2.7. Ống nghiệm 18 x 150 mm

5. Hoá chất, thuốc nhuộm, môi trường tế bào thận lợn

5.1. Nguyên liệu cơ bản: Hoá chất dùng trong môi trường và pha chế dung dịch phải sử dụng loại tinh khiết A.R.; nước cất 2 lần trung tính đã qua kiểm nghiệm không có tạp chất ảnh hưởng đến tế bào và vi rút sinh trưởng. Nên sử dụng những thành phần cơ bản hoặc thành phần đã chế sẵn, nhưng khi dùng phải tuân theo chỉ dẫn của nơi sản xuất.

5.2. Hoá chất, thuốc nhuộm, môi trường tế bào (phụ lục)

5.2.1. Rửa và nhuộm tiêu bản

5.2.1.1. Kháng huyết thanh dịch tả lợn (để nhuộm trực tiếp và gián tiếp)

5.2.1.2. Conjugat kháng thể huỳnh quang (nhuộm trực tiếp)

5.2.1.3. Conjugat kháng thể huỳnh quang (nhuộm gián tiếp)

5.2.1.4. Vi rút dịch tả lợn cường độc tiêu chuẩn

5.2.1.5. Dung dịch đệm muối phot phát pH 7,0

5.2.1.6. Dung dịch xanh evans

5.2.1.7. Dung dịch đệm Tris pH 8,6

5.2.1.8. Axêton

5.2.2. Chế môi trường và xử lý mẫu thử trước khi cấy

5.2.2.1. Clorofoc

5.2.2.2. Natrihydro cacbonat, dung dịch 1,4% và 7% (NaHCO_3)

5.2.2.3. Dung dịch đỏ phenol (phenol red)

5.2.2.4. Dung dịch kháng khuẩn tố penicillin và Streptomycin

5.2.2.5. Dung dịch muối điện giải Hanks

5.2.2.6. Dung dịch trypsin

5.2.2.7. Dung dịch hydro-lysat-lactalbumin

5.2.2.8. Dung dịch Hanks để xử lý mẫu thử và rửa tế bào

5.2.2.9. Dung dịch Versen

5.2.2.10. Huyết thanh bê sơ sinh

5.2.3. Môi trường tế bào

5.2.3.1. Môi trường Eagle cần thiết cho tế bào sinh trưởng (minium essential medium Eagle-growth; MEM-G)

5.2.3.2. Môi trường Eagle cần thiết để bảo quản tế bào (minium essential medium Eagle-maintenance; MEM-M)

5.2.4. Kỹ thuật sản xuất tế bào thận lợn

6. Cách tiến hành

6.1. *Tuỳ theo tình hình và điều kiện của từng cơ sở mà tiến hành trước sau hoặc cùng một lúc cả hai phương pháp: Nhuộm trực tiếp và gián tiếp*

6.2. *Phương pháp nhuộm trực tiếp mẫu thử cắt lạnh hoặc áp in*

6.2.1. Chuẩn bị mẫu thử: dùng máy cắt lạnh, cắt mẫu thử thành những lát cắt có độ dày từ 5-6 micrômét. Đặt nhẹ và dàn đều lát cắt lên 2 phiến kính A và B bằng mũi pince đầu nhọn (mỗi phiến kính đặt từ 2-3 lát) hoặc áp in nhẹ mẫu thử thành các vết mỏng (thay cho lát cắt). hong khô tiêu bản và cố định bằng axêton ở - 25 °C trong 60 phút

6.2.2. Nhuộm

6.2.2.1. Phiến kính A (để xác định virus dịch tả lợn) đặt trên lớp bông thấm nước trong đĩa petri, nhỏ 0,2-0,3 ml conjugat kháng thể huỳnh quang (thuốc nhuộm trực tiếp) lên tiêu bản, ủ 37 °C trong 30 phút. Lấy ra ngâm rửa 3 lần, mỗi lần 10 phút bằng dung dịch điện muối photphat pH 7,0; tráng nước cất, hong khô đọc kết quả.

6.2.2.2. Phiến kính B (đối chứng ức chế đặc hiệu) đặt trên lớp bông thấm nước trong đĩa petri, nhỏ 0,2-0,3 ml kháng huyết thanh dịch tả lợn lên tiêu bản, ủ 37 °C trong 15 phút. Lấy ra rửa nước cất rồi nhỏ tiếp lên tiêu bản 0,2-0,3 ml conjugat kháng thể huỳnh quang (thuốc nhuộm trực tiếp) và làm tiếp theo 5.3.2.1

6.3.1. Chuẩn bị mẫu thử: Cân 10 g mẫu thử (lá lách), dùng kéo cắt nhỏ, nghiền trước trong cối sứ, nghiền tiếp trong máy nghiền, vừa nghiền vừa hoà lẫn dung dịch Hanks có Penicillin và Streptomycin thành huyền dịch 1: 5. Ly tâm 2.000 vòng/ phút trong 15 phút. Lấy lượng nước trong pha loãng tiếp bằng dung dịch Hanks thành huyền dịch 10^{-1} đồng thời làm thêm mẫu thử cường độ dịch tả đối chứng.

6.3.2. Cấy mẫu thử vào môi trường tế bào thận lợn

6.3.2.1. Tế bào thận lợn nuôi cấy và đã phủ kín trên mặt lá kính trong ống leighton chứa 2 ml môi trường MEM-G sau 48-72 giờ

Mỗi mẫu thử phải nuôi cấy ít nhất trong 2 ống môi trường, kèm theo 3 ống đối chứng cho mỗi đợt kiểm nghiệm

Các ống môi trường được ký hiệu riêng:

- A. Để xác định virus dịch tả lợn trong mẫu thử
- B. Đối chứng ức chế đặc hiệu
- C. Đối chứng dương tính
- D. Đối chứng âm tính (kiểm tra tế bào thận lợn)

6.3.2.2. Gạn bỏ lượng môi trường cũ đi và rửa lớp tế bào bằng môi trường MEM -M từ 2-3 lần, cấy vào các ống A, B mỗi ống 0,2-0,3 ml huyền dịch mẫu thử 10^{-1} vào ống C. 0,2-0,3 ml huyền dịch vi rút dịch tả lợn 10^{-1} vào ống D. 0,2 - 0,3 ml môi trường MEM-M, ủ tất cả 37 °C từ 1-2 giờ. Gạn bỏ lượng nước vừa cấy và rửa lớp tế bào bằng môi trường MEM-M từ 2-3 lần, sau bổ sung vào mỗi ống 2ml môi trường MEM-M ủ 37 °C từ 24-48 giờ

6.3.3. Nhuộm: Dùng pince lấy lá kính, cố định bằng axêton ở - 25 °C trong 10 phút, hong khô

- Nhuộm các lá kính A, C, D theo 6.2.2.1

- Nhuộm lá kính B theo 6.2.2.2

6.4. Phương pháp nhuộm gián tiếp mẫu thử (chung cho cả 2 loại tiêu bản)

6.4.1. Chuẩn bị mẫu thử: Theo 6.2.1. (mẫu thử cắt lạnh hoặc áp in); 6.3.1. và 6.3.2. (mẫu thử cấy trong môi trường tế bào).

6.4.2. Nhuộm (chung cho cả 2 loại tiêu bản) cố định tiêu bản bằng axêton ở - 25 °C trong 10 phút, hong khô, nhỏ lên tiêu bản 0,2-0,3 ml kháng huyết thanh dịch tả lợn; ủ 37 °C trong 30 phút. Lấy ra ngâm rửa 2 lần, mỗi lần 5 phút bằng dung dịch đệm muối photphat pH 7,0. Nhỏ tiếp 0,2-0,3 ml conjugat kháng thể huỳnh quang (loại thuốc nhuộm gián tiếp đã pha loãng theo chỉ dẫn

của nơi sản xuất), ủ 37 °C trong 30 phút, sau ngâm rửa 2 lần, mỗi lần 3 phút bằng dung dịch đệm muối photphat pH 7,0. Gắn lam kính lên trên tiêu bản, đọc kết quả.

6.5. Nhận định một số chỉ tiêu giữa hai phương pháp nhuộm

Chỉ tiêu	Nhuộm trực tiếp		Nhuộm gián tiếp	
	Cất lạnh in áp	Môi trường tế bào	Cất lạnh in áp	Môi trường tế bào
Thời gian (giờ)	2-3	50-75	2-3	50-75
Tỷ lệ phát hiện dương tính (%)	80	85	90	95

7. Tính toán kết quả

7.1. Dùng kính hiển vi huỳnh quang đặt trong buồng tối, đọc kết quả các mẫu đối chứng trước, mẫu kiểm nghiệm sau.

Chung cho cả 2 phương pháp:

- Trên mẫu D (kiểm tra tế bào) không có hoặc có rất ít những điểm phát quang giả màu xanh nâu
- Trên mẫu C (đối chứng dương tính): Có nhiều tế bào hoặc đám tế bào phát quang màu vàng xanh, trải đều trong nguyên chất, chung quanh tế bào có màu sáng, lượng phát quang tỷ lệ thuận với số lượng virus, riêng phương pháp nhuộm gián tiếp cho kết quả rõ hơn (sáng trên nền xanh Evans)
- Trên mẫu B (đối chứng ức chế đặc hiệu) như mẫu D
- Trên mẫu A: Nếu kết quả đọc được như mẫu C là dương tính và ngược lại là âm tính

7.2. Kết luận chung cho cả 2 phương pháp

Mẫu thử A	Mẫu thử B	Mẫu thử C	Mẫu thử D	Kết luận
+	-	+	-	Có virus dịch tả lợn
+	+	+	-	Sai sót kỹ thuật (làm lại)
-	-	+	-	Không có virus dịch tả lợn

PHỤ LỤC

HOÁ CHẤT, THUỐC NHUỘM, MÔI TRƯỜNG TẾ BÀO THẬN LỢN

A. Dùng rửa tiêu bản và pha loãng conjugat kháng thể huỳnh quang (nhuộm gián tiếp)

A1. Dung dịch đệm muối photphat pH 7,0.

A1.1. Dung dịch 1

- Natri dihydrophotphat (NaH_2PO_4) 14 g
- Nước cất 2 lần (trung tính) 1.000 ml

A1.2. Dung dịch 2

- Natri dihydrophotphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 35,85 g

- Nước cất 2 lần (trung tính) 1.000 ml

A1.3. Dung dịch hoàn chỉnh

- Dung dịch 1 39 ml
 - Dung dịch 2 61 ml
 - Natri clorua (NaCl) 8,77 g
 - Nước cất 2 lần (trung tính) 900 ml

Hấp 121 °C trong 30 phút. Bảo quản 4 °C

A2. Dung dịch xanh evans

- Xanh evans 0,25 g
 - Nước cất 2 lần (trung tính) 100 ml

Hấp 115 °C trong 10 - 15 phút. Bảo quản 4 °C

A3. Dung dịch đệm Tris pH 8,6

- Tris, dung dịch 2,4% trong nước 25 ml
 - Axit clohydric, dung dịch 0,2 N (HCl) 6,1 ml
 - Nước cất 2 lần (trung tính) vừa đủ 100 ml

Lọc vô khuẩn. Bảo quản 4 °C

Ghi chú: Axit clohydric, dung dịch 0,2 N (HCl)

- Axit clohydric đậm đặc 2 ml
 - Nước cất 2 lần (trung tính) 98 ml

Hấp 121 °C trong 15 phút.

B. Dùng chế môi trường và xử lý mẫu thử trước khi cấy

B1. Natri hydrocacbonat, dung dịch 1,4% hoặc 7% (NaHCO₃)

- Natri hydrocacbonat 1,4 g hoặc 7 g
 - Nước cất 2 lần (trung tính) vừa đủ 100 ml

Lọc Seitz. Bảo quản 4 °C

B2. Dung dịch đỏ phenol (Phenol red)

- Đỏ phenol 0,4 g
 - Natri hydroxit, dung dịch 0,1 N trong nước (khoảng) 10-12 ml
 - Nước cất 2 lần (trung tính) vừa đủ 100 ml

Nghiền đỏ phenol trong cối sứ, nhỏ dần dung dịch Natri hydroxit vào cho đến khi đỏ phenol tan hoàn toàn, sau đó bổ sung nước cất 2 lần vừa đủ 100 ml. Hấp 121 °C trong 30 phút (nếu cần thì chỉnh pH 7,0 bằng Natri hydroxit dung dịch 0,05 N trước khi hấp)

Ghi chú: Natri hydroxit dung dịch 0,1 N hoặc 0,05 N

- Natri hydroxit 2 g hoặc 1 g
 - Nước cất 2 lần (trung tính) 100 ml

B3. Kháng khuẩn tố, dung dịch có 20.000 đơn vị Penicillin và Streptomycin trong 1 ml nước

- Penicillin (bột để tiêm) 2.000.000 đơn vị
 - Streptomycin (bột để tiêm) 2.000.000 mg

- Nước cất 2 lần (trung tính) 100 ml
- Bảo quản - 20 °C

B4. Dung dịch muối điện giải Hanks

B4.1. Dung dịch 1

- Natri clorua (NaCl) 160 g
- Kali clorua (KCl) 8 g
- Magiê sulphat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 4 g
- Canxi clorua ($CaCl_2$) 2,8 g
- Nước cất 2 lần (trung tính) 1.000 ml

Cho thêm clorofoc 2 ml. Bảo quản 4 °C

B4.2. Dung dịch 2

- Natri hydro photphat ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) 3,04 g
- Kali dihydro photphat (KH_2PO_4) 1,00 g
- Glucose 20 g
- Dung dịch đỏ phenol (B2) 100 ml
- Nước cất 2 lần (trung tính) vừa đủ 1.000 ml

Cho thêm clorofoc 2 ml. Bảo quản 4 °C

B4.3. Dung dịch hoàn chỉnh

- Dung dịch 1 50 ml
- Dung dịch 2 50 ml
- Nước cất 2 lần (trung tính) 900 ml

Hấp 115 °C trong 10 phút. Bảo quản 4 °C

Khi dùng cho thêm Natri hydro cacbonat, dung dịch 1,4% (B1): 2,5 ml

B5. Dung dịch Trypsin

- Trypsin 1 g
- Dung dịch Hanks (B4,3) 100 ml

Lắc nhẹ cho tan. Để ở 4 °C từ 12-18 giờ, để tiếp trong nồi chưng cách thuỷ ở 37 °C trong 3 phút cho trypsin tan hoàn toàn. Lọc vô khuẩn bằng phễu thuỷ tinh xốp. Cho thêm dung dịch kháng khuẩn tố (B3) 1 ml. Chia vào các lọ nhỏ. Bảo quản - 20 °C. Khi dùng pha loãng tiếp thành đậm độ 0,25%.

B6. Dung dịch hydrolysat lactabumin

- Hydrolysat lactabumin 5 g
- Dung dịch Hanks (B4.3) 1.000 ml

Hấp 121 °C trong 10 phút. Bảo quản 4 °C

B7. Dung dịch Hanks để xử lý, pha loãng mẫu thử và rửa tế bào

- Dung dịch Hanks (B4.3) 100 ml
- Dung dịch kháng khuẩn tố (B3)

- | | |
|--|------|
| + Để xử lý mẫu thử | 2 ml |
| + Để pha loãng mẫu thử (10^{-1}) và rửa tế bào | 1 ml |

B8. Dung dịch đệm Versen

- | | |
|---|----------|
| - Natri clorua | 8 g |
| - Kali clorua | 0,2g |
| - Natri hydro photphat ($\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 0,41 g |
| - Versen | 0,2 g |
| - Đỏ phenol | 0,01 g |
| - Nước cất 2 lần (trung tính) | 1.000 ml |

Hoà tan. Lọc vô khuẩn. Bảo quản 4°C

C. Môi trường nuôi tế bào**C1. Môi trường Eagle cần thiết để cho tế bào sinh trưởng (MEM-G)**

- | | |
|---|-------|
| - Dung dịch hydrolysate lactalbumin (B6) | 90 ml |
| - Dung dịch kháng khuẩn tố penicillin và Steptomycin (B3) | 1 ml |
- Điều chỉnh pH 7,2 bằng Natri hydro cacbonat, dung dịch 7% (B1)
- Huyết thanh bê sơ sinh 10 ml

Bằng thao tác vô khuẩn trộn đều, chia vào các bình tam giác 50 ml. Dùng để nuôi cấy tế bào thận lợn

C2. Môi trường Eagle cần thiết để bảo quản tế bào (MEM-M)

Thành phần như C1, chỉ khác là dùng 1 ml huyết thanh bê sơ sinh thay cho 10 ml. Dùng cấy mẫu thử (phân lập virus dịch tả lợn).

D. Kỹ thuật sản xuất tế bào thận lợn

- D1. Chọn tế bào: Dùng tế bào thận lợn sơ sinh, khoẻ mạnh, không có bệnh
- D2. Tách tế bào bằng dung dịch Trypsin (B5) dưới tác động của máy khuấy từ
- D3. Loại bỏ trypsin và thu gom tế bào bằng máy ly tâm
- D4. Pha mẫu bằng MEM-G. Đếm số tế bào bằng buồng đếm bạch huyết cầu dưới kính hiển vi thông thường.
- D5. Tính số lượng tế bào cần thiết để định tỷ lệ pha loãng bằng MEM-G (yêu cầu 50.000 tế bào/1 ml môi trường)
- D6. Chia vào ống leighton có ghép lá kính, mỗi ống 2 ml, ủ 37°C từ 24 -72 giờ. Khi tế bào đã sinh trưởng và phủ kín trên mặt lá kính thì cấy mẫu thử (theo 6.3.2)

Ghi chú: Nếu sử dụng tế bào dòng thì pha chế theo chỉ dẫn của nơi sản xuất, nếu chuyển tiếp tế bào dòng thì dùng dung dịch versen (B8) để làm bong lớp tế bào rồi dùng dung dịch trypsin (B5) tách tế bào và làm tiếp theo phụ lục D2 đến D6.

THỊT TƯƠI**Hướng dẫn chung về kỹ thuật chế biến và yêu cầu vệ sinh***Fresh meat**Guide for processing and hygienic requirements*

Tiêu chuẩn này quy định những hướng dẫn chung về kỹ thuật chế biến và yêu cầu vệ sinh cần thiết nhất cho thịt tươi dùng làm thức ăn cho người, bán trực tiếp hoặc qua chế biến bao gồm từ khâu giết mổ gia súc đến khâu vận chuyển thịt nhằm đảm bảo việc cung cấp thịt chất lượng cao và hợp vệ sinh.

Tiêu chuẩn này phù hợp với CAC/RCP 11-1976.

1. Định nghĩa

- 1.1. Lò mổ:** Các cơ sở được cơ quan kiểm tra cho phép và đăng ký sử dụng để giết mổ gia súc làm thức ăn cho người.
- 1.2. Dấu:** Bất kỳ dấu hiệu hoặc dấu đóng nào do cơ quan kiểm tra cho phép, trong đó bao gồm cả thẻ hoặc nhãn hiệu mang các dấu trên.
- 1.3. Thân thịt:** Thân gia súc được giết mổ sau khi đã chọc tiết và lột da.
- 1.4. Làm sạch:** Loại bỏ các chất không phù hợp.
- 1.5. Sự nhiễm bẩn:** Việc nhiễm trực tiếp hoặc gián tiếp các chất không phù hợp.
- 1.6. Cơ quan kiểm tra:** Cơ quan có thẩm quyền được Nhà nước giao nhiệm vụ kiểm tra vệ sinh kể cả việc thanh tra thịt đối với lò mổ hoặc các cơ sở khác.
- 1.7. Sự tẩy uế:** Việc sử dụng các hoá chất hoặc tác nhân vật lý hợp vệ sinh và các phương pháp để làm sạch bề mặt nhằm loại trừ vi khuẩn.
- 1.8. Pha thịt:**
 - a. Đối với gia súc giết mổ ngoài lợn, cừu và cừu non, dê và dê non loại bỏ đầu, da lông, phủ tạng (có hoặc không có thận), cơ quan sinh dục, bóng đái. Thân thịt được cắt tới khuỷu chân trước và chân sau. Đối với gia súc lấy sữa mới đẻ hoặc đang có sữa thì loại bỏ cả đầu vú.
 - b. Đối với lợn: Loại bỏ lông kể cả lông cứng, da, móng chân, mi mắt, phủ tạng (không có hoặc có thận), cơ quan sinh dục, bóng đái, bầu vú của lợn mới sinh con hoặc đang chữa, phần ngoài của cơ quan thính giác trừ khi đối với phần đó được làm vệ sinh sạch sẽ.

Ban hành theo quyết định số 735/QĐ ngày 31 tháng 12 năm 1990 của Ủy ban Khoa học Nhà nước

- c. Đối với cừu và cừu non, dê và dê non: Loại bỏ đầu (trừ trường hợp với cừu non và dê non) lông, da kể cả đầu, phủ tạng (không có hoặc có thân), cơ quan sinh dục, bóng đái, thân thịt được cắt bỏ tới khuỷu chân trước và chân sau, bầu vú của những con đang cho sữa, mới đẻ hoặc đang có chữa.
- d. Đối với đại gia súc, lợn và động vật móng lẻ khi cần thì xẻ thân thịt. Xẻ thân thịt là xẻ dọc theo sống lưng.

- 1.9. Phụ phẩm ăn được:** Đối với gia súc giết mổ, các phụ phẩm ăn được là những phần được xác định là phù hợp để làm thức ăn cho người.
- 1.10. Cơ sở:** Những nhà xưởng được cơ quan kiểm tra chấp thuận đăng ký để chuẩn bị chế biến, bao gói hoặc bảo quản thịt tươi.
- 1.11. Phù hợp làm thức ăn cho người:** Những bộ phận được thanh tra viên kiểm tra và đóng dấu thích hợp không có những hậu quả do biến đổi bệnh lý, sự phân giải hoặc sự nhiễm bẩn.
- 1.12. Thịt tươi:** Theo mục đích của tiêu chuẩn này, là thịt chưa qua bất kỳ dạng xử lý nào với mục đích bảo quản, trừ trường hợp thịt đã ướp lạnh thì vẫn được coi là "tươi".
- 1.13. Thanh tra viên:** Cán bộ được đào tạo đầy đủ do cơ quan kiểm tra Nhà nước cử để thanh tra thịt và kiểm tra vệ sinh. Sự theo dõi vệ sinh thịt, kể cả thanh tra thịt phải là trách nhiệm do bác sỹ thú y đảm nhiệm.
- 1.14. Người quản lý** là người chịu trách nhiệm quản lý lò mổ hay cơ sở.
- 1.15. Thịt:** Phần ăn được của bất kỳ gia súc nào được giết trong lò mổ.
- 1.16. Nước uống:** Nước trong, sạch, chất lượng tốt.
- 1.17. Quần áo bảo hộ:** Loại quần áo đặc biệt mặc bên ngoài nhằm tránh gây ô nhiễm thịt của người làm việc trong lò mổ gồm cả mũ đội đầu và giày dép.
- 1.18. Động vật giết mổ:** Bất kỳ động vật có vú nào đưa vào lò mổ để giết mổ.

2. Yêu cầu đối với động vật giết mổ

Thịt của động vật được khẳng định không làm thực phẩm cho người được do động vật bị tai nạn, bị ảnh hưởng của dịch bệnh hoặc bị nhiễm thuốc hay hoá chất thì động vật đó không được đưa vào lò mổ; trừ trường hợp có chứng nhận của bác sỹ thú y đã khám kiểm tra, cho phép động vật đó có thể giết mổ làm thức ăn cho người. Chỉ có bác sỹ thú y làm công tác kiểm soát sát sinh tại lò mổ có quyền quyết định động vật đó có được giết mổ hay không hoặc được cấp những chứng chỉ cần thiết.

3. Vận chuyển động vật giết mổ

Cấu trúc phương tiện

Mọi phương tiện vận chuyển phải có cấu trúc sao cho:

- a) Có thể bốc dỡ động vật dễ dàng.
- b) Tách riêng từng loại động vật trong khi vận chuyển.
- c) Việc rơi vãi các chất thải trên sàn xe phải được hạn chế tới mức thấp nhất bằng cách dùng sàn lưới hoặc các trang bị tương tự.
- d) Phải có thông gió thích hợp.
- e) Nếu phương tiện có nhiều tầng thì động vật ở tầng dưới phải được bảo vệ bằng sàn không thấm từ phía trên.
- f) Để làm vệ sinh và tiêu độc.

4. Điều kiện xây dựng và yêu cầu vận hành

Xây dựng và lắp đặt cơ sở

4.1. Xây dựng

- a) Lò mổ và cơ sở phải được xây dựng ở địa điểm không hay xảy ra lụt bão, không bị ảnh hưởng của những mùi khó chịu, khói bụi hoặc các thứ ô nhiễm khác.
- b) Lò mổ và cơ sở phải có đủ không gian cần thiết để đảm bảo hoạt động sản xuất.
- c) Cấu trúc phải chắc chắn và đảm bảo việc thông gió thích hợp, đủ ánh sáng tự nhiên hoặc nhân tạo và dễ làm vệ sinh.
- d) Nhà cửa và thiết bị của lò mổ và cơ sở phải thường xuyên được bảo dưỡng tốt.
- e) Cơ sở và lò mổ phải được trang bị đầy đủ để dễ theo dõi vệ sinh của thịt và hoạt động của thanh tra viên kiểm tra thịt.
- f) Cơ sở và lò mổ phải được thiết kế đảm bảo chống được sự thâm nhập của côn trùng, chim, chuột và các loại ký sinh có hại khác.
- g) Trong mỗi lò mổ và cơ sở phải có vách ngăn cách rõ ràng giữa các khu vực chế biến những phần ăn được và khu vực có những phần không ăn được.
- h) Không kể những phòng dành cho công nhân và thanh tra viên nghỉ ngơi, tất cả những phòng khác đều phải có:
 - Sàn nhà không thấm nước, không nhiễm độc, không dính, hút ẩm và dễ làm vệ sinh và tiêu độc. Sàn nhà không được trườn, không có khe rãnh trừ những phòng cấp đông và bảo quản thịt đông lạnh. Mặt sàn phải có độ nghiêng cần thiết để nước dễ thoát vào các đường rãnh có lưới ngăn.
 - Tường nhà phải làm bằng các vật liệu không thấm nước, không độc hại, không hút dính, dễ làm vệ sinh và tiêu độc, nhẵn và có độ cao ngang tầm hoạt động (giết mổ, chế biến) phải có màu trắng, dễ rửa sạch. Những góc giữa các tường và mép giữa tường và sàn phải được lót.
 - Trần nhà phải được thiết kế và cấu trúc, tránh đọng bụi, đọng hơi nước và dễ làm vệ sinh.
- k) Lò mổ và cơ sở phải có hệ thống thoát, thải thích hợp và hệ thống này thường xuyên hoạt động tốt. Các đường thoát nước (kể cả bể chứa nước thải) phải đủ lớn để chứa được các chất thải tối đa.

Tất cả các đường ống không được rò rỉ nước, có cửa vào và thoát ra thích hợp. Những chỗ chứa chất thải, lọc giữ rác bẩn, nơi lắng đọng phải bố trí ở những nơi cách biệt với khu giết mổ, pha lọc, bao gói và bảo quản thịt. Việc xử lý chất thải phải được tiến hành sao tránh làm ô nhiễm nước uống. Hệ thống ống dẫn chất thải và việc vận hành chúng phải được cơ quan kiểm tra chấp thuận.

4.2. Lò mổ phải bao gồm các khu vực sau đây:

- 4.2.1. Khu vực thích hợp và trang bị đầy đủ để tiến hành công tác khám thịt.
- 4.2.2. Khu vực che lợp đủ lớn để nuôi nhốt động vật; nếu điều kiện khí hậu cho phép thì sử dụng những khu nuôi nhốt không mái che.

Những khu vực này phải đáp ứng yêu cầu sau đây:

- Chuồng trại hoặc vật dụng phải được sắp xếp và bố trí để việc khám gia súc trước khi giết mổ được thuận tiện; các khu chuồng hoặc sân nhốt động vật phải được thiết kế và bảo hành, rải lát và có trang bị hệ thống cấp, thoát nước tốt.
- Hệ thống cấp nước có áp suất đủ để phục vụ công tác dọn vệ sinh chuồng, sàn, đường đi nơi

bố xếp và phương tiện vận chuyển gia súc.

- Đủ chuồng, giống để đảm bảo cho công tác khám sống, đồng thời có đủ dụng cụ để ngăn giữ động vật (giống, máng, buồng nhỏ) để nhốt giữ gia súc khi cần khám gần, khám cẩn thận.
- Chuồng và sân nhốt phải được trang bị để động vật thuộc các loài khác nhau không sang lẫn lộn
- Ở những nơi điều kiện khí hậu cho phép thì cần có trang bị để tắm rửa gia súc trước khi giết mổ.

- 4.2.3. Phải có khu cách ly gia súc ốm và gia súc nghi bị ốm. Khu vực này phải có mái che và tường bao xung quanh nếu điều kiện khí hậu yêu cầu và phải có khoá. Hệ thống nước thải khu này phải độc lập, không đổ lẫn hoặc chảy qua các khu khác.
- 4.2.4. Khu giết mổ và pha lọc phải đảm bảo dễ thao tác. Nếu có điều kiện nên bố trí riêng nơi giết mổ lợn. Trường hợp lợn được giết mổ chung với các loài gia súc khác thì khu vực nhúng nước cạo lông lợn phải bố trí ở nơi riêng.
- 4.2.5. Phải có khu vực riêng biệt để xả chất chứa và rửa đường tiêu hóa của gia súc.
- 4.2.6. Phải có khu vực tiếp tục xử lý và ngâm rửa các cơ quan của đường tiêu hóa gia súc.
- 4.2.7. Nếu cần thiết, phải có khu vực riêng để xử lý mỡ gia súc. Nếu mỡ không xuất đi hàng ngày, thì phải có thiết bị để bảo quản mỡ.
- 4.2.8. Phải có khu vực riêng để bảo quản da, sừng, móng và mỡ không ăn được, trừ trường hợp chúng được xuất đi hàng ngày.
- 4.2.9. Phải có phòng lạnh để làm lạnh và bảo quản thịt.
- 4.2.10. Để giết mổ những gia súc đã nêu ở trên, phải có đủ phương tiện để cố định chúng và treo móc thịt chúng. Những phương tiện này được bố trí thuận tiện và gần chuồng nhốt động vật. Nếu thịt đã được đánh giá đảm bảo vệ sinh làm thức ăn cho người thì phải được vận chuyển sang khu vực riêng của lò mổ hoặc cơ sở, sao cho tránh bị ô nhiễm. Những phương tiện này không được lắp đặt ở những lò mổ mà cơ quan kiểm tra đã cấm giết mổ những gia súc đã nêu trên.
- 4.2.11. Phải có các phương tiện trong từng phòng riêng, hoặc từng phần riêng trong một phòng, có thể kiểm tra và khoá để giữ và bảo quản thịt bị nghi ô nhiễm. Các phòng này phải được thiết kế có thể tránh khả năng gây ô nhiễm sang các loại thịt khác hoặc có thể thịt bị đánh tráo.
- 4.2.12. Phải có phòng, có thể khoá được để giữ thịt loại thải, trừ khi có các phương tiện khác để giữ thịt này.
- 4.2.13. Phải có trang thiết bị để kiểm tra việc đi vào ra tại các khu vực giết mổ.
- 4.2.14. Phải có trang thiết bị bố trí thích hợp cho việc làm vệ sinh tiêu độc xe chuyên chở.
- 4.2.15. Phải có địa điểm bố trí riêng để thu dọn phân rác và tiêu huỷ chúng.
- 4.3. Tại các cơ sở pha lọc thịt phải có:**
- 4.3.1. Các khu vực phải thích hợp để kiểm tra thịt.
- 4.3.2. Phòng lạnh hoặc phòng để thịt. Phòng có trang thiết bị để khống chế được nhiệt độ, để pha lọc thịt. Việc pha thịt, lọc thịt và gói thịt tách riêng khỏi phòng bao gói. Tuy nhiên cũng có thể tiến hành bao gói ngay trong phòng pha lọc thịt nhưng phải có các biện pháp được cơ quan kiểm tra chấp thuận nhằm tránh gây ô nhiễm cho thịt.
- 4.4. Các phương tiện làm lạnh.** Cấu trúc và trang bị của phòng làm lạnh, cấp đông, kho đông lạnh hoặc tủ đông lạnh phải đáp ứng đầy đủ yêu cầu nội dung của tiêu chuẩn này.

4.5. Trang bị vệ sinh và kiểm tra

- 4.5.1. Những hoạt động nào có thể gây ô nhiễm cho thịt cần tách riêng khỏi các hoạt động khác nhằm tránh được sự ô nhiễm đó
- 4.5.2. Khu, phòng, thiết bị và dụng cụ để giết mổ chỉ cho phép dùng để giết mổ, không được dùng để pha, lọc hoặc bảo quản thịt
- 4.5.3. Lò mổ và cơ sở phải được trang bị để tránh mọi sự tiếp xúc giữa thịt với sàn, tường hoặc với các cấu trúc khác, trừ những dụng cụ, thiết bị cho phép tiếp xúc với thịt
- 4.5.4. Phòng giết mổ phải có trang bị sao cho việc chọc tiết, mổ gia súc được tiến hành ở tư thế treo. Nếu có trang bị giá hoặc khay sắt để lột da thì phải đáp ứng được yêu cầu đã được ghi ở mục 4.5.13. và phải có độ cao đủ đảm bảo thịt không chạm sàn.
- 4.5.5. Lò mổ và cơ sở phải có trang bị đường ray trần để vận chuyển thịt và phải bố trí sao cho tránh được ô nhiễm thịt.
- 4.5.6. Hệ thống cung cấp nước phải đầy đủ, và phải có các phương tiện dự trữ, phân phối nước kèm theo hệ thống bảo vệ chống ô nhiễm nước.
 - Nước dùng trong lò mổ và cơ sở phải là nước uống được.
 - Nước không phải là nước uống được có thể sử dụng vào một số mục đích như: Đun tạo hơi nước làm lạnh, hoặc phòng hoả. Hệ thống nước này phải hoàn toàn riêng biệt, được đánh dấu bằng màu khác, không cắt - giao nhau hoặc hút ra cùng đường với nước uống.
- 4.5.7. Việc cấp nước nóng uống được ở nhiệt độ không dưới 82°C phải đảm bảo liên tục trong thời gian làm việc.
- 4.5.8. Ánh sáng tự nhiên hoặc nhân tạo không đổi màu phải được đảm bảo thường xuyên trong toàn bộ lò mổ hay cơ sở. Cường độ ánh sáng không được thấp hơn:
 - 540 lux ở các địa điểm kiểm tra
 - 220 lux ở các phòng làm việc
 - 110 lux ở các khu vực khácNhững nguồn sáng cùng chao đèn được treo phía trên nơi làm thịt, ở bất kỳ giai đoạn nào; đèn phải là dạng an toàn, có hệ thống bảo vệ trong trường hợp bị vỡ.
- 4.5.9. Phải có hệ thống thông gió thích hợp để tránh nóng, hơi nước, tránh đọng nước và đảm bảo không khí ở các khu vực không bị ô nhiễm hơi và các mùi, bụi, khói hoặc hơi nước. Các cửa thông gió phải có lưới che. Cửa sổ phải đóng panô kín, cửa nào mở phải có lưới che. Lưới che phải là loại dễ tháo gỡ để làm vệ sinh. Bộ cửa sổ phía trong phải làm dốc để tránh sử dụng làm giá để đồ đạc.
- 4.5.10. Cửa ra vào phải đủ lớn và được làm chắc chắn, trừ khi có hệ thống thông gió hoặc tự động đóng theo cả hai chiều.
- 4.5.11. Tất cả các cầu thang trong khu vực chứa thực phẩm phải có cấu trúc sao cho:
 - Dễ làm vệ sinh và không gây ô nhiễm bởi các vật liệu được chuyển lên hoặc chuyển xuống.
 - Ở mé phải có thành cao, ít nhất là 10 cm tính từ mép của bậc thang.
- 4.5.12. Buồng thang máy phải có cấu trúc để bảo vệ thịt không bị ô nhiễm, cụ thể sàn và tường của buồng thang máy phải được bọc bằng vật liệu không thấm nước, cửa buồng thang máy phải phẳng, nhẵn. Nếu sơn nên sơn màu sáng, sàn thang máy cũng phải có đường thoát nước để có thể làm vệ sinh thuận tiện.
- 4.5.13. Hề nhà, cầu thang, gióng chuồng và các thiết bị tương tự khác ở bất kỳ khu nào, được dùng để

chế biến thịt phải được thiết kế sao cho dễ làm vệ sinh và phải bền vững không bị mòn và không han rỉ. Khu vực nhốt gia súc bằng giống thì phải có thêm khu vực kiểm tra và vệ sinh.

4.5.14. Tất cả các phòng giết mổ pha lọc, bao gói và các công đoạn chế biến khác phải có phương tiện để rửa tay, có ống thoát nước và được bố trí thuận tiện cho người làm việc. Nước để rửa tay phải là nước ấm, van máy nước rửa tay phải là loại không phải vặn mở. Phải có trang bị xà phòng hoặc các chất rửa tay không có mùi.

4.5.15. Phòng giết mổ, pha lọc, bao gói và các công đoạn chế biến khác phải có trang bị vệ sinh tiêu độc thuận tiện, bố trí thuận tiện cho người làm việc sử dụng. Các phương tiện này chủ yếu để làm vệ sinh và tiêu độc các loại dụng cụ như dao, rựa, cưa và các dụng cụ khác.

Các phương tiện dùng để vệ sinh và tiêu độc dụng cụ phải có cấu tạo và kích thước sao cho có thể làm vệ sinh tiêu độc dụng cụ có hiệu quả. Những phương tiện này phải được làm bằng kim loại không rỉ và chúng cũng để làm vệ sinh.

Các phương tiện dùng để vệ sinh và tiêu độc dụng cụ phải phù hợp hệ thống cung cấp nước nóng với lượng đầy đủ và có nhiệt độ không thấp hơn 82°C trong suốt thời gian gia súc được giết mổ và thịt được pha chế.

4.6. *Lò mổ và cơ sở phải có các tiện nghi sau:*

4.6.1. Phương tiện cho người làm việc: Phòng thay quần áo, phòng sấy khô, nhà vệ sinh có vòi nước xả, nhà tắm và nơi rửa tay được chiếu sáng đầy đủ, có quạt thông gió và lò sưởi ấm. Những nơi này không mở thông trực tiếp với khu làm việc. Nơi rửa tay phải có nước nóng và nước lạnh với loại van ấn không vặn và phải có dụng cụ làm khô và hợp vệ sinh. Những nơi sử dụng giấy lau, thì phải có trang bị đầy đủ ống cuốn giấy, đồ đựng giấy bố trí ngay nơi sử dụng. Chất thải từ hệ thống này, không được nối vào hệ thống nước thải của nơi sản xuất, trước khi chảy vào bể chứa cuối cùng.

4.6.2. Phương tiện cho thanh tra viên khám thịt: Phòng thay quần áo, phòng sấy khô, phòng ăn, nhà vệ sinh, nhà tắm, nơi rửa tay, được chiếu sáng đầy đủ có quạt thông gió và lò sưởi ấm. Nơi rửa tay phải có nước nóng và nước lạnh với loại van ấn không vặn, và phải có dụng cụ làm khô hợp vệ sinh. Những nơi sử dụng giấy lau, thì phải có trang bị đầy đủ ống cuốn giấy, đồ đựng giấy bố trí ngay nơi sử dụng.

4.7. ***Phải có phòng làm việc riêng cho công tác khám thịt.*** Phải có phòng kiểm nghiệm phục vụ công tác khám thịt và vệ sinh thực phẩm.

5. **Trang thiết bị và dụng cụ:**

5.1. ***Tất cả các trang thiết bị, dụng cụ, đồ dùng sử dụng tại lò mổ và cơ sở tiếp xúc với thịt phải có bề mặt nhẵn phẳng, không thấm nước, không rỉ và phải được làm từ vật liệu không độc hại, không gây truyền mùi, vị, không có các góc khe lõm, không dính hút và chịu được việc thường xuyên vệ sinh tiêu độc.***

Những thiết bị cố định phải được bố trí dễ làm vệ sinh tiêu độc. Thiết bị phải có cấu trúc thuận tiện cho việc vệ sinh tiêu độc.

5.2. ***Trang thiết bị dụng cụ sử dụng*** cho các loại sản phẩm không làm thức ăn hoặc loại bỏ phải được phân biệt riêng và chúng không được sử dụng cho loại sản phẩm làm thức ăn.

5.3. ***Trang thiết bị dụng cụ sử dụng để giết mổ chỉ được dùng để giết mổ, không được dùng để pha lọc hoặc làm các công đoạn tiếp theo.***

5.4. ***Không được sử dụng côngtenơ, hòm, thùng bằng gỗ hoặc các tông, ở những nơi động vật được giết mổ, pha lọc, bao gói và bảo quản.*** Không được phép để côngtenơ, thiết bị dụng cụ ở nơi giết mổ, pha lọc, bao gói và bảo quản thịt trừ trường hợp cần khi sử dụng khẩn cấp.

6. Yêu cầu vệ sinh trong vận hành

6.1. Các tiện nghi phục vụ cho thanh tra viên, khám thịt bao gồm cả phòng làm việc phải được thường xuyên giữ gìn sạch sẽ.

- 6.1.1. Tất cả các trang thiết bị, dụng cụ, bàn, đồ dùng kể cả dao, dao phay, búa, cưa và thùng đựng phải thường xuyên được làm vệ sinh trong một ngày. Mỗi khi thiết bị và dụng cụ này tiếp xúc với thịt bị dịch bệnh, vật liệu bị ô nhiễm thì phải làm vệ sinh và tiêu độc ngay, kỹ lưỡng. Sau mỗi ngày làm việc những trang thiết bị và dụng cụ đem sử dụng phải được vệ sinh tiêu độc lần cuối.
- 6.1.2. Người lãnh đạo nhóm khám thịt phải đảm bảo là công tác vệ sinh và tiêu độc được tiến hành theo đúng quy định của tiêu chuẩn này.
- 6.1.3. Các thân thịt không được để bị ô nhiễm khi làm vệ sinh tiêu độc trang thiết bị và dụng cụ.
- 6.1.4. Mỗi khi những vật dụng cụ như xe, thùng từ khu sản phẩm ăn được đã đi sang khu sản phẩm không làm thức ăn thì trước lúc quay về phải làm vệ sinh ngay và phải làm vệ sinh cẩn thận.
- 6.1.5. Các chất tẩy rửa, vệ sinh, hoá chất tiêu độc phải được y tế chấp thuận và không cho phép có tiếp xúc với thịt. Những lượng tồn dư của các chất đó ở sân tường, hoặc ở trang thiết bị phải được rửa thật sạch bằng nước uống được trước khi tiếp tục sử dụng để làm thịt. Các trang thiết bị, dụng cụ được vệ sinh tiêu độc phải được rửa sạch lại bằng nước uống được trước khi sử dụng lại.
- 6.1.6. Không được sử dụng các dụng cụ pha chế chất vệ sinh, chất sơn nhuộm có khả năng gây ô nhiễm cho thịt ở trong lò mổ hoặc cơ sở nơi gia súc được hoặc có thể được giết mổ, được hoặc có thể pha lọc, bao gói thịt.
- 6.1.7. Trừ trường hợp phục vụ công tác vệ sinh, còn lại tất cả các loại hoá chất có khả năng ô nhiễm sang thịt đều không được bảo quản trong bất cứ bộ phận nào của lò mổ, hoặc cơ sở nơi giết mổ của gia súc và pha lọc, bao gói và bảo quản thịt. Tuy nhiên các vật liệu xây dựng bảo dưỡng lò mổ hoặc cơ sở có thể sử dụng bất cứ lúc nào nếu qua kiểm tra thấy không có nguy cơ gây ô nhiễm thịt.

6.2. Kiểm tra dịch hại

- 6.2.1. Một chương trình liên tục hữu hiệu nhằm khống chế côn trùng, chim chóc, chuột và các loại sâu bọ độc hại khác ở lò mổ và cơ sở phải được duy trì và hoạt động.
- 6.2.2. Lò mổ, cơ sở và các vùng xung quanh phải được thường xuyên kiểm tra dấu vết có nhiễm côn trùng, chim chóc, chuột bọ và các độc hại khác.
- 6.2.3. Nếu các loại côn trùng có hại xâm nhập lò mổ, cơ sở phải áp dụng ngay các biện pháp tiêu diệt. Các biện pháp tiêu diệt chuột bọ phải được thực hiện dưới sự theo dõi cẩn thận và do thanh tra viên có trình độ giám sát.
- 6.2.4. Chỉ những loại thuốc trừ dịch hại được phép sử dụng ở lò mổ mới được phép sử dụng cho lò mổ và cơ sở mà phải do cơ quan có thẩm quyền cho phép và phải có các biện pháp để phòng hết sức cẩn thận, để tránh ô nhiễm thịt. Chỉ cho phép sử dụng thuốc trừ dịch hại khi các biện pháp phòng trừ khác không còn hiệu quả.
- 6.2.5. Chỉ sử dụng thuốc trừ dịch hại sau khi đã đưa hết thịt ra khỏi buồng, trang thiết bị và dụng cụ phải được che đậy sau khi phun thuốc, các trang thiết bị và dụng cụ phải được rửa kỹ trước khi dùng lại.
- 6.2.6. Thuốc trừ dịch hại hoặc các chất độc hại khác phải được bảo quản ở những nơi riêng biệt, được khoá cẩn thận và chỉ được xuất ra sử dụng do những cán bộ được uỷ quyền và được đào tạo. Mọi biện pháp để phòng phải được áp dụng để tránh ô nhiễm thịt.

- 6.3. Ngoài gia súc đưa vào giết mổ**, không cho phép bất cứ động vật nào đi vào lò mổ, trừ những gia súc sử dụng làm sức kéo vận chuyển. Không cho phép động vật đưa vào cơ sở chế biến thịt.
- 6.4. Vệ sinh và sức khoẻ nhân viên**
- 6.4.1.** Lãnh đạo lò mổ hoặc cơ sở phải có trách nhiệm đào tạo thường xuyên, thích hợp cho người làm việc về thao tác vệ sinh đối với thịt, các thói quen vệ sinh để người làm việc có thể luôn đề phòng, chống gây ô nhiễm thịt.
- 6.4.2.** Phải quy định định kỳ kiểm tra sức khoẻ đối với công nhân làm thịt, thanh tra viên khám thịt và các đối tượng khác có tiếp xúc với thịt tại lò mổ và cơ sở. Việc khám sức khoẻ này phải thực hiện trước khi tuyển dụng và lặp lại khi có những dấu hiệu về mặt lâm sàng hay dịch tễ học.
- Khi khám sức khoẻ cần chú ý
- Các vết thương, vết đau truyền nhiễm
 - Các bệnh đường tiêu hoá kể cả ký sinh trùng và trạng thái mang trùng, đặc biệt là đối với *Salmonella*.
 - Các bệnh đường hô hấp
- 6.4.3.** Người lãnh đạo lò mổ hoặc cơ sở phải quan tâm để đảm bảo chắc chắn rằng không có các công nhân làm việc khi biết hoặc nghi mình mắc bệnh hoặc có mang mầm bệnh truyền nhiễm sẽ làm lây lan bệnh qua thịt, hoặc khi có vết thương, vết đau truyền nhiễm, ỉa chảy mà vẫn làm việc ở những khu vực trong lò mổ hoặc cơ sở nơi có khả năng làm lây lan trực tiếp hoặc gián tiếp các vi trùng độc hại sang thịt. Các ca ốm đau phải báo ngay cho lãnh đạo biết.
- 6.4.4.** Bất cứ người chế biến thịt nào bị thương, đứt tay phải ngừng ngay công việc cho đến khi đã băng bó cẩn thận mới tiếp tục làm việc giết mổ, pha lọc, bao gói thịt. Không được phép mang vết thương băng bó hở để chế biến thịt, trừ khi các vết thương được bọc bằng vật liệu không thấm nước, có màu dễ nhận biết và không có khả năng bị bong rời.
- 6.4.5.** Theo yêu cầu của thanh tra viên thì người lãnh đạo lò mổ và cơ sở tổ chức khám sức khoẻ cho công nhân và trình giấy này cho lãnh đạo.
- 6.4.6.** Tất cả mọi người làm việc trong lúc thao tác phải luôn luôn rửa tay bằng xà phòng hoặc chất sát trùng trong nước ấm, chảy liên tục. Phải rửa tay trước khi làm việc, ngay sau khi đi vệ sinh, sau khi tiếp xúc với vật liệu ô nhiễm, và tất cả những lúc cần thiết khác, khi làm việc với các thứ bị ô nhiễm dịch bệnh hoặc nghi ô nhiễm phải rửa tay ngay, phải có biển báo nhắc nhở rửa tay.
- 6.4.7.** Tất cả những người làm việc trong những khu vực của lò mổ và cơ sở phải đảm bảo vệ sinh cá nhân ở mức độ cao trong khi làm việc và luôn luôn phải có quần áo bảo hộ bao gồm:
- Mũ đội đầu
 - Giấy cũng làm từ chất liệu có thể giặt rửa được trừ trường hợp là các loại dùng một lần rồi huỷ bỏ các trang bị đó phải phù hợp yêu cầu vệ sinh và bền vững trong môi trường làm việc. Yếm (tạp dề), áo bảo hộ không được rửa ngay trên sàn.
- 6.4.8.** Tất cả những người đến thăm lò mổ, cơ sở đều phải mặc quần áo bảo hộ.
- 6.4.9.** Không được sử dụng những khu vực giết mổ gia súc, pha lọc, bao gói bảo quản thịt trong lò mổ và cơ sở để làm nơi thải bỏ dụng cụ, thay quần áo.
- 6.4.10.** Quần áo bảo hộ, dao, dây lưng và các dụng cụ khác phải xử lý ở nơi riêng biệt và không có khả năng làm ô nhiễm thân thịt hoặc thịt.
- 6.4.11.** Tất cả những sinh hoạt mà có thể làm ô nhiễm thịt như ăn uống, hút thuốc, nhai kẹo cao su phải bị cấm ở tất cả những khu vực giết mổ gia súc, pha lọc, bao gói, bảo quản và vận chuyển thịt.
- 6.4.12.** Nếu dùng gang tay thì phải giữ trong điều kiện tốt, sạch sẽ, hợp vệ sinh. Mang gang tay không

có nghĩa là người làm việc không cần rửa tay cẩn thận. Găng tay phải được làm từ vật liệu không thấm nước trừ các trường hợp mà tính chất công việc không yêu cầu hoặc không thích hợp..

6.4.13. Công tác quản lý lãnh đạo phải được bố trí để đảm bảo thực hiện đúng các điều 6.4.3, 6.4.4, 6.4.6, 6.4.7, 6.4.8, 6.4.9, 6.4.10, 6.4.11, 6.4.12.

7. Yêu cầu đối với sản xuất và thao tác

7.1. Những nguyên tắc cần theo dõi trong khi giết mổ và chế biến thịt

7.1.1. Mọi gia súc đưa đi giết mổ phải được khám trước và sau khi giết mổ.

7.1.2. Không được giết mổ gia súc và pha lọc thịt tại lò mổ hoặc cơ sở nếu không có mặt của thanh tra viên.

7.1.3. Bất kỳ một gia súc nào nếu bắn thiu không chấp nhận được, đều phải được rửa ráy cho đến khi thanh tra viên đồng ý, trước khi đưa vào giết mổ, để giảm bớt nguy cơ ô nhiễm.

7.1.4. Mọi gia súc đã đưa đến phòng giết mổ đều phải giết mổ ngay, không chậm trễ.

7.1.5. Việc phóng tiết phải làm triệt để đến mức tối đa. Nếu định dùng tiết này vào việc chế biến thức ăn thì phải chứa và giữ hợp vệ sinh, không được khuấy bằng tay, mà phải bằng những dụng cụ hợp vệ sinh.

7.1.6. Việc gây choáng, chọc tiết, hứng tiết nên làm với một tốc độ phù hợp với việc cạo lông.

7.1.7. Phải làm cẩn thận việc chọc và hứng tiết để thân thịt và những phần cắt bỏ ăn được giữ sạch sẽ, không nên để xuống sàn và phải tránh mọi sự ô nhiễm.

7.1.8. Một khi đã lột da, cạo lông thì thân thịt phải để tách rời nhau, tránh tiếp xúc và ô nhiễm. Thân thịt, phủ tạng, đều phải để cùng nhau cho đến khi thanh tra viên khám thịt và cho đạt yêu cầu. Thân thịt chỉ nên tiếp xúc với các dụng cụ cần để giữ, làm sạch và khám xét.

7.1.9. Trước khi lấy thịt hoặc não ra khỏi đầu gia súc để dùng làm thực phẩm, đầu (trừ lông) phải được rửa sạch sẽ bằng nước uống được cho đến khi được sự chấp thuận của thanh tra viên.

7.1.10. Cắt lưỡi gia súc tại nơi lưỡi tụt xuống, sao cho các hạnh nhân khỏi bị cắt.

7.1.11. Những điểm sau đây cần phải lưu ý trong quá trình lột da

- Tất cả các loại gia súc (trừ lợn) đều phải lột da và trước khi mổ gia súc, lấy phủ tạng, sao cho để thân thịt không bị ô nhiễm. Cấm bơm hơi vào giữa da và thân thịt để lột da. Lợn cần phải được cạo sạch lông cứng, rửa sạch, có thể lột da từng phần hay toàn bộ. Nước trong bể cạo lông nên thay thường xuyên nếu có thể được.
- Thân thịt đã lột da không nên rửa nước mà để nước lọt vào khoang bụng hay khoang ngực trước khi mổ lấy phủ tạng.
- Bầu vú của gia súc cái đang tiết sữa hoặc bị bệnh rõ rệt nên cắt bỏ khỏi thân thịt. Việc cắt bỏ những bầu vú như thế nên tiến hành vào một thời điểm thích hợp và sớm nhất trong quá trình mổ lấy phủ tạng không được để các chất tiết gây ô nhiễm thân thịt, nên cắt bỏ bầu vú sao cho đầu vú và bầu vú còn nguyên vẹn, bầu vú và các tuyến sữa vẫn kín.

7.1.12. Phải lấy phủ tạng ra ngay khi giết mổ xong.

7.1.13. Trong quá trình mổ lấy phủ tạng ra cần chú ý những điểm sau đây:

- Cần tránh để chảy lọt bất kỳ chất gì ra ngoài trừ thực quản, dạ cò, ruột, trực tràng, túi mật, bóng đái, tử cung hay đầu vú.
- Những phần cắt bỏ làm thực phẩm cho người cần phải được lấy ra sao cho tránh ô nhiễm cho các bộ phận khác.

- Không nên tách ruột ra khỏi dạ dày trong khi mổ lấy phủ tạng, không làm rách, thủng, hở các đoạn ruột trừ khi cần thiết theo yêu cầu của quá trình mổ. Trong những trường hợp đó phải buộc các đoạn ruột lại trước khi cắt. Đối với cừu, bê con, lợn, thì ruột và dạ dày được lấy ra không tách rời khỏi nhau.
- Tinh hoàn, dương vật phải lấy ra khỏi thân thịt.

- 7.1.14. Trong mọi lò mổ, thân thịt, thịt và các phần cắt rời ăn được phải rửa bằng nước uống được ở vòi.
- 7.1.15. Không được dùng giấy, vải, bọt biển, bàn chải để rửa thân thịt. Tuy nhiên điều này không áp dụng đối với việc sử dụng bàn chải trong khi giết mổ lợn bị chảy thui.
- 7.1.16. Không được bơm không khí vào thân thịt (thịt hay phần cắt bỏ ăn được) dù bằng cơ học hay bất kỳ phương thức nào, trừ những thủ tục có tính chất lễ nghi đòi hỏi phải bơm hơi vào phổi.
- 7.1.17. Không được rửa, lọc thịt da, để lưu giữ da tại bất kỳ khu vực nào trong lò mổ hoặc trong khu vực dùng cho giết mổ, lấy phủ tạng, sơ chế hay bảo quản thịt làm thực phẩm.
- 7.1.18. Phải chuyển ra khỏi nơi giết mổ càng sớm càng tốt tất cả dạ dày, ruột và các phần cắt bỏ không ăn được theo quy định của thanh tra viên, phải làm công việc đó sao tránh gây ô nhiễm sàn, tường và vào bất kỳ thân thịt, thịt hay những phần cắt bỏ ăn được.
- 7.1.19. Tất cả dạ dày ruột, những phần cắt bỏ không ăn được phải xử lý tiếp tục trong những khu vực riêng của lò mổ đảm bảo cho việc dễ dọn sạch và vệ sinh.
- 7.1.20. Phân và mọi thứ bẩn thỉu gây ô nhiễm cho thân thịt trong quá trình giết mổ phải được dọn đi cẩn thận.
- 7.1.21. Ở nơi nào mà thanh tra viên nhận xét cách giết mổ gia súc hay lấy phủ tạng hay những điều kiện giữ, sơ chế, bao gói thịt, sẽ ảnh hưởng xấu đến:
- + Mức độ sạch sẽ của thân thịt, hoặc là
 - + Vệ sinh của sản phẩm, hoặc là
 - + Hiệu quả khám thịt
- thì người thanh tra viên yêu cầu người quản lý lò mổ phải uốn nắn những thiếu sót hoặc phải giảm bớt tốc độ sản xuất hoặc tạm đình chỉ hoạt động một thời gian của bất kỳ một bộ phận nào trong lò mổ.
- 7.1.22. Trong lò mổ, việc khám sau khi giết mổ phải tiến hành ngay sau khi mổ.

Trước lần khám cuối cùng, tất cả các bộ phận yêu cầu cho khám đều phải giữ tương ứng với thân thịt.

Trước lần khám cuối cùng, không được bỏ đi một phần nào mà không có sự đồng ý của thanh tra viên.

7.2. **Đóng dấu thịt đạt yêu cầu dùng cho người**

- 7.2.1. Thịt sau khi đã được thanh tra viên khám và chấp nhận sử dụng cho người, thì phải đóng dấu theo quy định của thú y về kiểm sát sát sinh trước và sau khi giết mổ.
- 7.2.2. Tem và dấu đánh loại, thanh tra viên phải giữ gìn sạch sẽ trong khi sử dụng và do thanh tra viên giữ.
- 7.2.3. Chỉ có đóng dấu chín hoặc dùng những mực dấu thích hợp mới được dùng cho thịt.

7.3. **Việc điều hành tiếp theo khâu khám thịt sau giết mổ (bao gồm cả việc bảo quản).**

- 7.3.1. Thịt sau khi qua khâu khám thịt đạt yêu cầu sử dụng cho người phải được giữ, bảo quản vận chuyển sao cho tránh bị ô nhiễm và giảm phẩm chất của thịt.

- 7.3.2. Thịt đã qua kiểm tra, đạt tiêu chuẩn dùng làm thực phẩm phải được chuyển ngay khỏi khu vực giết mổ, đưa vào bảo quản lạnh đặt ở vị trí thuận lợi cho thanh tra viên khám thịt để làm việc. Hoặc cũng có thể được phép tiến hành pha lọc với điều kiện chuyển trực tiếp từ khu giết mổ vào phòng chế biến. Tại phòng chế biến phải được kiểm tra nhiệt độ phòng đó và có khoảng cách thích hợp của các lô hàng đặt trong phòng. Pha lọc và bao gói phải làm ngay và sau đó chuyển ngay sang phòng lạnh hoặc phòng chế biến.
- 7.3.3. Những quy định sau đây áp dụng tại những nơi chứa các thân thịt, mảnh thân thịt hoặc các phần có thể làm thực phẩm (ở phòng bảo quản, làm lạnh hoặc cấp đông).
- a) Chỉ những người có nhiệm vụ trong quy trình sản xuất, khi thật cần thiết mới được vào.
 - b) Không được để ngõ cửa: Sau khi ra vào phải đóng cửa ngay lập tức.
 - c) Không được xếp sản phẩm quá số lượng và dung tích so với thiết kế.
 - d) Nơi nào không được lắp đặt thiết bị làm lạnh, thì phải có thiết bị đo nhiệt độ tự động.
 - e) Phải có sổ ghi chép theo dõi chi tiết toàn bộ lượng thịt xuất, nhập tại các kho bảo quản, làm lạnh, cấp đông.
 - g) Nếu không có máy ghi tự động thì phải thường xuyên đo nhiệt độ cách nhau một khoảng thời gian nhất định và nhiệt độ đo được ghi vào sổ.
- 7.3.4. Nơi mà thân thịt, phần của thân thịt hoặc các phụ phẩm làm thực phẩm được đưa vào làm mát, những điều sau đây phải được lưu ý thêm vào ngoài những điều đã được nêu ở mục 7.3.2.
- Phải có phương pháp tin cậy để điều khiển việc làm mát thân thịt hoặc các phần thân thịt để trong phòng.
 - Thịt phải được treo hoặc đặt trong các khay không rỉ sao cho khí lạnh lưu chuyển hợp lý xung quanh thịt.
 - Thịt phải được xếp sao cho tránh việc chảy nước từ miếng nọ xuống miếng kia.
 - Nhiệt độ, độ ẩm và lưu thông không khí phải phù hợp với điều kiện nhiệt độ bảo quản thịt.
 - Phải có phương pháp chống ngưng đọng hơi nước bằng cách vận hành hợp lý các phương tiện làm lạnh, kết hợp với lắp đặt tường trần cách ly hoặc có bộ phận dưới trần nhà và các phương pháp phù hợp khác. Nếu máy lạnh lắp trên cao thì phải có tấm ngăn chống nhỏ nước ở phía dưới. Nếu là loại máy lạnh đặt trên sàn thì phải có đường ống thoát nước riêng trừ khi máy được đặt sát đường thoát nước của sàn.
- 7.3.5. Nơi để thân thịt, phần thân thịt hoặc phụ phẩm làm thực phẩm để cấp đông thì ngoài những điều đã nêu ở mục 7.3.2. thì cần lưu ý những điều sau đây:
- Nếu thịt không để sẵn trong hộp các tông thì phải treo hoặc để ở khay không rỉ sao cho việc lưu thông không khí xung quanh thịt được thuận tiện.
 - Hộp các tông phải được bố trí sao cho không khí lưu thông dễ dàng xung quanh thịt.
 - Thịt không đựng trong hộp các tông thì phải sắp xếp sao cho nước từ miếng nọ không nhỏ xuống miếng kia
 - Nếu thịt xếp vào khay thì phải chú ý không để đáy khay trên tiếp xúc với thịt ở khay bên dưới.
 - Giàn lạnh phải xả đá thường xuyên để tránh đọng đá quá nhiều và giảm hiệu quả. Phải có biện pháp dẫn nước thải do xả đá ra ngoài mà không làm ảnh hưởng tới sản phẩm.
- 7.3.6. Nơi thân thịt, phần thân thịt hoặc các phụ phẩm làm thực phẩm được bảo quản đông lạnh ngoài những điều đã nêu ở mục 7.3.2. thì cần lưu ý những điều sau đây:

- Không được đặt thịt vào phòng bảo quản đông lạnh khi nhiệt độ trung bình trong thịt chưa hạ xuống tới mức quy định.
- Không được đặt thịt trực tiếp xuống sàn mà phải có đệm lót hoặc giá lót. Sắp xếp thịt ở dạng mảnh hay đưng trong hộp các tông sao cho sự lưu thông không khí được thích hợp.
- Kho đông lạnh phải hoạt động ở nhiệt độ bảo quản thích hợp với từng loại sản phẩm.
- Sự dao động lên xuống của nhiệt độ trong kho bảo quản phải giới hạn ở mức nhỏ nhất. Nơi thịt được bảo quản ở dạng không bao gói thì nhiệt độ của giàn lạnh nhiệt độ của thịt càng chênh lệch ít càng tốt.

8. Bao gói và vật liệu bao gói

- 8.1. Vật liệu dùng để bao gói phải được bảo quản và sử dụng trong điều kiện sạch sẽ và vệ sinh.
- 8.2. Vật liệu dùng để bao gói phải đủ để bảo vệ thịt khỏi bị ô nhiễm trong quá trình làm việc, vận chuyển và bảo quản.
- 8.3. Vật liệu dùng để bao gói phải không độc hại hoặc không để lại bất cứ dấu vết có hại gì trên thịt hoặc làm ô nhiễm thịt.
- 8.4. Vật liệu dùng để bao gói thịt mới giết mổ hoặc thịt mới làm mát để vận chuyển trong nội bộ cơ sở hoặc từ cơ sở này sang cơ sở khác có thể tùy chọn nhưng phải chú ý để không làm ô nhiễm thịt.
- 8.5. Thùng hoặc hộp các tông để bao gói thịt phải có hộp lót bên trong. Tuy nhiên hộp lót trong cũng có thể không có nếu như từng miếng thịt riêng biệt đã được bao gói trước khi cho vào thùng hoặc hộp các tông.

9. Vận chuyển

- 9.1. Không được vận chuyển thịt bằng xe chở động vật sống.
- 9.2. Thịt không được vận chuyển chung với các hàng hoá khác có thể gây ảnh hưởng tới thịt.
- 9.3. Da dầy chỉ được chuyển đi khi đã làm sạch kỹ càng hoặc đã trần qua nước nóng; đầu và chân chỉ chuyển khi đã lột da hoặc đã làm lông.
- 9.4. Không được vận chuyển thịt bằng phương tiện mà trước đó chưa khử trùng tiêu độc.
- 9.5. Thân thịt, nửa thân hoặc các mảnh 1/4, ngoài việc đã được bao gói và cấp đông, phải được treo hoặc xếp trên giá khi vận chuyển.
- 9.6. Phương tiện vận chuyển và côngtennơ phải đáp ứng những yêu cầu sau đây:
 - 9.6.1. Phía bên trong phải được làm từ vật liệu không rỉ, nhẵn phẳng, không thấm nước, để dọn vệ sinh và tiêu độc.
 - 9.6.2. Những khớp nối hoặc cửa phải gắn kín để tránh sâu bọ thâm nhập gây ô nhiễm.
 - 9.6.3. Cấu trúc và trang bị phải đáp ứng được yêu cầu đảm bảo giữ được nhiệt độ thích hợp trong suốt thời gian vận chuyển.
 - 9.6.4. Xe vận chuyển phải được trang bị sao cho tránh thịt chạm xuống sàn xe.
 - 9.6.5. Sản phẩm làm thức ăn không bao gói phải được vận chuyển bằng côngtennơ đóng kín và phải vận chuyển trong điều kiện có máy lạnh trừ trường hợp thời gian vận chuyển không quá 2 giờ và côngtennơ được cách nhiệt tốt.
 - 9.6.6. Phải tránh không để thịt đông lạnh trong suốt thời gian bảo quản và vận chuyển bị thay đổi nhiệt độ. Nếu có hiện tượng rã đông, thì thanh tra viên sẽ khám thịt lại và đề ra các biện pháp tiếp theo để áp dụng.

10. Thịt không làm thức ăn cho người

10.1. Thịt loại thải tức không làm thức ăn cho người phải đưa ngay vào những nơi chứa riêng để phân biệt như mùng, thùng, xe tải, xe lăn hoặc phòng hoặc các phương tiện khác phục vụ mục đích này và được giữ dưới sự theo dõi của thanh tra viên.

Để dễ nhận biết nên có hình thức làm thế nào để miếng thịt có dấu đóng chỉ rõ là thịt không ăn được. Việc vận chuyển loại thịt này tới nơi xử lý phải được tiến hành theo chỉ dẫn của thanh tra viên sao cho không xảy ra hiện tượng lấy thịt đó hoặc gây ô nhiễm bởi thịt đó.

10.2. Không được phép mang ra khỏi cơ sở thân thịt, thịt, các phủ tạng hoặc mỡ bị loại bỏ, không dùng làm thực phẩm được, trừ trường hợp do thanh tra viên đã hướng dẫn xử lý và theo dõi.

10.3. Nếu ở cơ sở, lò mổ, có thân thịt, phần thân thịt, các phủ tạng hay mỡ bị loại bỏ, không làm thực phẩm được thì người quản lý có trách nhiệm sắp xếp để chuyển những thân thịt, phần thịt, các phủ tạng hay mỡ đó tới nơi xử lý chế biến theo đúng quy định hiện hành của thú y.

11. Chương trình giám sát thú y và kiểm tra vệ sinh

11.1. Tất cả các điều trong tiêu chuẩn này đều được bác sỹ thú y quốc gia giám sát. Cụ thể, phải tổ chức sao cho mỗi lò mổ, cơ sở phải có ít nhất một bác sỹ thú y quốc gia làm công tác giám sát kể cả khám thịt.

11.2. Khuyến khích các lò mổ, cơ sở vì lợi ích của mình mà bổ nhiệm một cá nhân không tham gia vào sản xuất mà chỉ chịu trách nhiệm về vệ sinh của lò mổ và cơ sở. Biên chế của người đó phải là cố định trong tổ chức nhân sự và phải được đào tạo chuyên sâu trong công tác làm vệ sinh dụng cụ, phương pháp tháo lắp thiết bị để làm vệ sinh, đánh giá được tầm quan trọng của vấn đề ô nhiễm và các kiểu độc hại có liên quan khác. Phải có thời gian biểu cho công tác vệ sinh để đảm bảo tốt tất cả các khu vực của lò mổ, cơ sở, được làm vệ sinh kịp thời. Những khu vực trang thiết bị, vật liệu đặc biệt phải được chỉ định vệ sinh, tiêu độc hàng ngày hoặc nhiều hơn nếu thấy cần thiết.

12. Các thủ tục kiểm tra phòng thí nghiệm

Để bổ xung cho công tác khám thịt thường xuyên và để bảo vệ lợi ích của mình, các lò mổ và cơ sở nên có phòng thí nghiệm để xét nghiệm phân tích phải tuân theo các phương pháp tiêu chuẩn để kết quả có thể chấp nhận được ngay.

13. Lò mổ lưu động hoặc tại chỗ

13.1. Loài tuần lộc, các động vật bán thuần hoá có thể được chấp nhận giết tại chỗ hoặc các nhà giết mổ lưu động. Nếu chúng được làm bất động phóng tiết, mổ thịt tại các nơi giết mổ đó và cũng phải qua khám sống và khám sau khi giết mổ.

13.2. Nội dung của tiêu chuẩn này quy định về kiểm sát sát sinh của thú y phải được áp dụng đối với nhà giết mổ lưu động và tại chỗ.

ĐỒ HỘP THỊT VÀ RAU

Phương pháp xác định hàm lượng nitrit và nitrat

Canned meat and vegetable
Methods for determination of nitrite and nitrate contents

Tiêu chuẩn này phù hợp với ST SEV 3451- 81.

1. Phương pháp xác định hàm lượng nitrit

1.1. Bản chất của phương pháp

Phương pháp này dựa trên việc đo cường độ màu tạo ra khi nitrit tác dụng với sunfanilamit và N-1 naphthyl etylen diamindihydroclorua trong dịch lọc không chứa prôtêin.

1.2. Nguyên tắc chung

- 1.2.1. Khi tiến hành thử cần tuân theo các yêu cầu của TCVN 1055-86 và các qui định hiện hành.
- 1.2.2. Để tiến hành thử, dùng thuốc thử “tinh khiết phân tích” (TK.PT) và nước cất hoặc nước cất có độ tinh khiết tương đương.

1.3. Mẫu thử

- 1.3.1. Lấy mẫu theo TCVN 4833-89 (ST SEV 2433-80)
- 1.3.2. Mẫu thử lấy được đem nghiền hai lần, khuấy đều, lèn chặt vào bình có nắp đậy kín.
Thời hạn bảo quản mẫu để phân tích không quá 24 giờ.
- 1.3.3. Giữ mẫu đã nghiền nhỏ ở nhiệt độ không lớn hơn 4°C cho đến khi kết thúc thử.

1.4. Thiết bị

Để tiến hành thử dùng các thiết bị sau:

- 1) Cối nghiền, máy trộn hay máy xay thịt dùng trong sinh hoạt có đường kính các lỗ dưới không lớn hơn 3mm;
- 2) Cân phân tích;
- 3) Bếp cách thủy;
- 4) Quang phổ kế hay máy so màu điện;
- 5) Bình định mức dung tích 100; 200; 1000cm³;
- 6) Pipet dung tích 2, 5, 10, 20 và 25cm³;
- 7) Phễu thủy tinh đường kính 5cm;

Ban hành theo quyết định số 733/QĐ ngày 31 tháng 12 năm 1990 của Ủy ban Khoa học Nhà nước

- 8) Bình nón dung tích khoảng 200 cm³;
- 9) Buret bán tự động hay liều lượng kế 2 và 10 cm³;
- 10) Ống đong dung tích 25 và 50 cm³;
- 11) Cốc thí nghiệm.

1.5. Thuốc thử và dung dịch

Để tiến hành cần có:

- 1) Kali feroxianua, dung dịch được chuẩn bị như sau: Hoà tan 106g kali feroxianua ngâm ba phần tử nước ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) trong nước cất, đổ nước đến dung tích 1dm³. Dung dịch được bảo quản trong bình thủy tinh sẫm màu. Thời hạn bảo quản không được quá 30 ngày;
- 2) Kẽm axetat, dung dịch được chuẩn bị như sau: Hoà tan 220g kẽm axetat ngâm hai phần tử nước [$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$] và 30 cm³ axit axetic đóng băng trong nước cất, đổ nước đến dung tích 1dm³. Thời hạn bảo quản không quá 30 ngày;
- 3) Axit axetic đóng băng (CH_3COO)H;
- 4) Natri tetraborat (borac), dung dịch bão hòa được chuẩn bị như sau: Hoà tan 50g natri tetraborat ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) trong 1dm³ nước cất ấm;
- 5) Natri nitrit ($NaNO_2$);
- 6) Axit Clohydric (HCl) dung dịch 12,50 mol/dm³, khối lượng riêng 1,19g/cm³;
- 7) Sunfanilamit ($NH_2C_6H_4SO_2NH_2$);
- 8) N-1 naphtyl etylen diamin dihydroclorua ($C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2 \cdot 2HCl$);
- 9) Dung dịch để tiến hành phản ứng màu.

Dung dịch I được chuẩn bị như sau: Hoà tan 2g sunfanilamit ($H_2NC_6H_4SO_2NH_2$) trong 400cm³ dung dịch axit Clohydric (1+1) đổ thêm cùng dung dịch axit Clohydric đó đến thể tích 1dm³.

Dung dịch II được chuẩn bị như sau: Hoà tan 1g N-1 naphtyl etylen diamin dihydroclorua trong 100cm³ nước và thêm nước đến thể tích 1dm³.

Cả hai dung dịch trên được để trong tủ lạnh trong bình thủy tinh sẫm màu, nút kín. Ở điều kiện trên dung dịch giữ bền trong 7 ngày.

- 10) Axit sunfuric (H_2SO_4) dung dịch 2,04 mol/dm³ (144);
- 11) Kali pecmanganat, ($KMnO_4$) dung dịch 0,02 mol/dm³, (0,1N).

1.6. Chuẩn bị thử

- 16.1. Cân 10g lượng mẫu cân, sai số không quá 0,001g cho vào bình định mức thể tích 200cm³, thêm 5cm³ dung dịch borac bão hòa và 100cm³ nước nóng, lắc đều khi các miếng thịt rã ra rồi đun nóng đồng thời thỉnh thoảng lắc trên bếp cách thủy đang sôi trong 15 phút. Sau khi để nguội bình đổ đến nhiệt độ phòng, lại thêm tiếp lần lượt mỗi loại 2cm³ dung dịch kaliferoxianua và kẽm axetat để kết tủa protein. Mỗi lần cho một loại dung dịch phải lắc đều, giữ trong khoảng 30 phút ở nhiệt độ phòng, cho thêm nước đến vạch mức, khuấy và lọc qua giấy lọc gấp vào bình tam giác khô. Dịch lọc dùng để xác định hàm lượng nitrit và nitrat.
- 16.2. Để xây dựng đồ thị chuẩn hoà tan 1,0000g natri nitrit với nước trong bình định mức dung tích 100cm³, thêm nước đến vạch mức (dung dịch A). Dung dịch này chuẩn bị sau khi đã xác định trước hàm lượng natri nitrit trong chế phẩm, phép xác định này được tiến hành như sau : cho 10cm³ dung dịch kali pecmanganat (0,02 mol/dm³) đã pha loãng bằng 10cm³ nước và axit hoá bằng 2cm³ dung dịch axit sunfuarit (1 + 4) được đem chuẩn độ với dung dịch natri nitrit có chứa 0,2g natri nitrit trong 100cm³ dung dịch. 1cm³ dung dịch (0,02 mol/dm³) kali pecmanganat tương ứng 0,00345g natri nitrit.

Cho 5cm³ dung dịch A vào bình định mức dung tích 1dm³ và thêm nước đến vạch mức (dung dịch B). Từ dung dịch B chuẩn bị một loạt dung dịch natri nitrit chuẩn. Để chuẩn bị các dung dịch chuẩn này, dùng pipet cho 5, 10, 20 cm³ dung dịch B lần lượt vào các bình định mức dung tích 100cm³ rồi cho nước đến vạch mức, lắc đều. Các dung dịch này chứa tương ứng 2,5; 5,0 và 10,0 µg/cm³ nitrit trong 1cm³ dung dịch.

Từ các dung dịch trên lấy mỗi loại 10cm³ cho vào bình định mức dung tích 100cm³.

Dùng nước cất làm dung dịch kiểm tra.

Cho vào mỗi bình định mức 10cm³ dung dịch I, lắc đều và để dung dịch vào chỗ tối trong 5 phút. Sau đó cho vào mỗi bình 2cm³ dung dịch II, lắc đều và lại giữ trong chỗ tối từ 3 đến 10 phút. Cho thêm nước đến dung tích 100cm³, lắc đều và đo mật độ quang của dung dịch ở bước sóng 538 nm, so sánh với dung dịch kiểm tra.

Dựa vào các giá trị thu được xây dựng đồ thị chuẩn trục tung là mật độ quang, trục hoành là nồng độ nitrit trong dung dịch đã nhuộm màu, tính bằng µg/cm³.

1.7. Tiến hành thử

Dùng pipet cho 25cm³ dịch lọc chuẩn bị theo điều 1.6.1 (hoặc ít hơn nhưng dung tích đo chính xác) vào bình định mức dung tích 100cm³, cho thêm nước đến dung tích xấp xỉ 60cm³ và 10cm³ dung dịch I, lắc đều, sau 5 phút cho tiếp 2cm³ dung dịch II và lại lắc đều. Sau mỗi lần cho một loại dung dịch thì đặt bình vào chỗ tối. Sau 3 đến 10 phút cho thêm nước đến 100cm³, lắc đều và đo mật độ quang như điều 1.6.2.

1.8. Xử lý kết quả

- 1.8.1. Hàm lượng nitrit (I), biểu thị bằng số miligam natri nitrit trong 1 kg sản phẩm, được tính theo công thức sau:

$$X = C \cdot \frac{20000}{m \cdot V} \quad (1)$$

Trong đó :

C - Nồng độ natri nitrit, đọc được trên đồ thị chuẩn tương ứng với mật độ quang của dung dịch mẫu thử, µg/cm³;

m - Khối lượng mẫu, g;

V - Thể tích dịch lọc, dùng cho phản ứng so màu, cm³;

- 1.8.2. Kết quả cuối cùng là kết quả trung bình cộng của hai phép xác định song song.

Sai số cho phép giữa các kết quả xác định song song không được vượt quá 10%.

- 1.8.3. Kết quả được tính với sai số đến 0,1mg/kg.

1.9. Biên bản thử

Biên bản thử gồm:

- 1) Tên sản phẩm đem thử và nơi sản xuất;
- 2) Kết quả thử;
- 3) Ghi lại các tác động của các điều kiện hoặc những tình huống không có trong tiêu chuẩn này mà có thể gây ảnh hưởng đến kết quả thử;
- 4) Số hiệu của tiêu chuẩn này;
- 5) Họ tên và chữ ký của người tiến hành thử;
- 6) Ngày, tháng tiến hành thử;

2. Phương pháp xác định hàm lượng nitrat

2.1. Bản chất của phương pháp

Phương pháp dựa trên việc thử nitrat thành nitrit bằng cột cadimi, đo trắc quang cường độ màu tạo thành khí sunfanilamit và N-1 naphtyletylen diamindihydroclorua tác dụng với nitrit và xác định lượng nitrit để tính chuyển ra nitrat sau khi đã trừ đi lượng nitrit chứa trong sản phẩm.

2.2. Mẫu thử

Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu theo điều 1.3.

2.3. Dụng cụ, thuốc thử và dung dịch.

Dụng cụ, thuốc thử và dung dịch theo điều 1.5 và 1.6

1) Cột thủy tinh (xem hình vẽ)

1- Bình chứa dung tích 50cm³

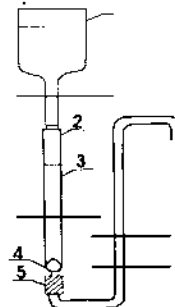
2- Nút

3- Lớp cadimi

4- Bình thủy tinh

5- Ống cao su.

Cột để khử nitrit



2) Máy trộn

3) Thiết bị kết tinh

4) Pipet

5) Cadimi sunfat ($\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), dung dịch được chuẩn bị như sau: Hoà tan 37g cadimi sunfat ngậm tám phân tử nước trong nước và thêm nước đến 1dm³.

6) Dinatri etylen diamin tetra axetat (di-Na-EDTA)

$[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{COONa}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

7) Natri nitrit NaNO_2 .

8) Kali nitrat KNO_3 .

9) Dung dịch đệm có pH từ 9,6 đến 9,7 được chuẩn bị như sau : 20cm³ axit clohydric, 12,50 mol/dm³ (1,19g/cm³), pha loãng bằng nước đến 500cm³, sau khi khuấy đều cho thêm 10g $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{COONa}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, và 55cm³ amoniac 17,75mol/dm³ (0,88g/cm³). Dung dịch được thêm nước đến 1dm³ và chuẩn độ pH.

10) Kẽm thanh

2.4. Chuẩn bị thử

2.4.1. Cho 5-7 thanh kẽm vào cốc có chứa sẵn 1000cm³ dung dịch cadimi sunfat. Khi cadimi tạo thành bám vào thanh kẽm, gạt cadimi vào cốc khác. Cadimi thu được đem rửa 2 lần bằng 1dm³ nước, sau đó dùng 400cm³ dung dịch axit clohydric 0,1mol/dm³ chuyển cadimi vào máy trộn, nghiền trong 10 giây. Chuyển tất cả từ máy trộn sang cốc phân tích, để lắng, thỉnh thoảng khuấy bằng đũa thủy tinh. Ngày hôm sau khuấy một lần nữa để bọt khí lên. Chắt chất lỏng ra sau đó rửa cadimi 2 lần bằng 1dm³ nước. Để một miếng bông thủy tinh vào đáy cột thủy tinh đã nút sẵn một đầu ống, sau đó cho cadimi vào cột bằng cách đổ cùng với nước đến khi được một lớp cao khoảng 17cm, thỉnh thoảng vận cho nước chảy ra nhưng không được để lớp cadimi bị lộ ra.

2.4.2. Rửa cột cadimi lần lượt bằng 25cm³ axit clohydric 0,1mol/dm³ và 50cm³ dung dịch đệm amoniac đã hoà với nước theo tỷ lệ 1+9. Tất cả các chất lỏng trên, được đưa vào qua bình chứa 1.

2.4.3. Để kiểm tra khả năng khử của cột cadimi, cần chuẩn bị các dung dịch sau: Dùng nước hoà tan 1,465g kali nitrat đã sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ 103°C trong bình định mức dung tích 100cm³, đổ nước đến vạch mức (dung dịch B). Lấy 5cm³ dung dịch B cho vào bình định mức dung tích 1000cm³ và đổ nước cho đến vạch (dung dịch C). Dung dịch C có chứa 73,25µg/cm³ kali nitrat. Cho vào bình chứa đồng thời dung dịch C và 5cm³ dung dịch đệm, sau

đổ rửa thành bình bằng nước hai lần, mỗi lần 15cm^3 và cho thêm nước vào bình chứa eluat từ cột lấy vào bình định mức dung tích 100cm^3 , tốc độ chảy của eluat không được quá $3\text{cm}^3/\text{phút}$.

Sau khi lấy được khoảng 100cm^3 eluat, lấy bình ra đổ nước cho đến vạch rồi lắc đều. Dùng pipet lấy 10cm^3 eluat cho vào bình định mức dung tích 100cm^3 , sau đó tiến hành như chỉ dẫn ở điều 1.7. Nếu nồng độ của natri nitrit (tính theo đồ thị chuẩn) nhỏ hơn $0,9\mu\text{g}/\text{cm}^3$ thì cột đó không dùng được.

2.4.4. Cadimi trong cột này phải được giữ dưới dung dịch axit clohydric $0,1\text{mol}/\text{dm}^3$.

2.4.5. Khả năng khử của cột cadimi phải được kiểm tra cho từng loại mẫu thử.

2.5. Tiến hành thử

2.5.1. Cho vào bình chứa đồng thời 20cm^3 dịch lọc được chuẩn bị theo điều 1.6.1 và 5cm^3 dung dịch đệm. Rửa thành bình hai lần bằng nước, mỗi lần 15cm^3 , cho đầy nước vào bình. Thu eluat vào bình định mức dung tích 100cm^3 . Đối với mỗi loại thử đều tiến hành phép thử kiểm tra bằng cách thay dịch lọc bằng nước.

2.5.2. Hàm lượng natri nitrit được xác định theo điều 1.7.

2.6. Xử lý kết quả

2.6.1. Hàm lượng nitrat (X_1), biểu thị bằng số kali nitrat trong 1kg sản phẩm, được tính theo công thức sau:

$$X_1 = 1,465 \left(C \cdot \frac{100000}{m_1 \cdot V_1} - X \right) \quad (2)$$

Trong đó:

C: Nồng độ nitrit, đọc được trên đồ thị chuẩn, tương ứng với mật độ quang của dung dịch, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

m_1 : Khối lượng mẫu, g;

V_1 : Thể tích eluat, dùng cho phản ứng so màu, cm^3 ;

X: Nồng độ nitrit, xác định trong cùng mẫu thử đó theo điều 1.8.1, mg/kg .

2.6.2. Kết quả cuối cùng là trung bình cộng kết quả của hai phép xác định song song.

Sai số cho phép giữa các kết quả xác định song song không được vượt quá 10%.

2.6.3. Kết quả được tính với sai số đến $0,1\text{mg}/\text{kg}$. Hàm lượng nitrat được biểu thị bằng kali nitrat có thể tính chuyển sang natri nitrat và ngược lại như sau:

$$\text{NaNO}_3 = 0,84 \text{ KNO}_3;$$

$$\text{KNO}_3 = 1,19 \text{ NaNO}_3;$$

2.7. Biên bản thử

Biên bản thử theo điều 1.9.

PHỤ LỤC

CÁC TIÊU CHUẨN QUỐC TẾ CÓ LIÊN QUAN

STT	Số hiệu tiêu chuẩn quốc tế	Tên gọi tiêu chuẩn
1	ST SEV 804 - 77	Thuốc thử. Chỉ dẫn chung và tiến hành thử
2	ST SEV 435 - 77	Thuốc thử. Phương pháp chuẩn bị thuốc thử và dung dịch phụ
3	ST SEV 2433 - 80	Thịt và sản phẩm thịt. Phương pháp lấy mẫu.

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT

Định lượng *E.coli* - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44°C

Sử dụng màng lọc

Meat and meat products - Enumeration of Escherichia coli
Colony-count technique at 44°C using membranes

TCVN 7135: 2002 hoàn toàn tương đương với ISO 6391: 1997;

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng *Escherichia coli* có trong tất cả các loại thịt và sản phẩm thịt, kể cả thịt gia cầm.

Phương pháp này cho phép phát hiện *Escherichia coli* (tip sinh học 1) và các biến thể không lên men lactoza hoặc sinh trưởng kỵ khí (xem tham khảo [1]).

Chú thích 1 - Phương pháp này có thể không thích hợp cho việc kiểm tra thịt đã chế biến có nhiều vi khuẩn sinh bào tử hiếu khí.

Chú thích 2 - Một số chủng *Escherichia coli* gây bệnh có thể không phát hiện được bằng phương pháp này.

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887 : 1983), Vi sinh vật học - Hướng dẫn chung về cách pha chế các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218 :1996), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc - Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.

3. Định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa sau đây:

3.1. *E.coli* (*Escherichia coli*): Vi khuẩn hình thành các khuẩn lạc indol dương tính (màu hồng) ở 44°C trên màng xenlulo axetat đặt trên môi trường thạch mật trypton dưới các điều kiện qui định trong tiêu chuẩn này.

4. Nguyên tắc

Nhìn chung, việc phát hiện *Escherichia coli* cần đến ba giai đoạn liên tiếp dưới đây.

4.1. Hồi phục

Cấy một lượng qui định của huyền phù ban đầu lên màng xenlulo axetat được đặt trên môi trường thạch glutamat khoáng cải tiến và ủ ở nhiệt độ 37°C khoảng 4 h.

Chú thích - Qui trình này cho phép hồi phục lại các *E. Coli* bị hư hại do bảo quản đông lạnh, do làm khô hoặc do các điều kiện lạnh hoặc bị hư hại do xử lý nhiệt hoặc do hoá chất. Đồng thời cũng làm giảm nồng độ của tất cả các cacbon hidrat có thể lên men nếu chúng có mặt trong mẫu thử với nồng độ cao, đều có thể gây cản trở việc sinh indol trong giai đoạn phân lập tiếp theo.

4.2. Phân lập

Chuyển các màng trên môi trường thạch glutamat khoáng cải tiến ở giai đoạn hồi phục sang môi trường thạch mật trypton. Ủ ở nhiệt độ 44°C trong thời gian từ 18 h đến 20 h.

4.3. Phát hiện

Sự có mặt E. Coli trên màng được biểu hiện bằng sự sinh indol từ mỗi khuẩn lạc.

4.4. Tính toán

Tính số lượng E. Coli có trong một mililit hoặc trong một gam mẫu từ số khuẩn lạc indol dương tính thu được trên màng ở các độ pha loãng đã chọn để thu được các kết quả có ý nghĩa.

5. Dịch pha loãng, môi trường nuôi cấy và thuốc thử**5.1. Khái quát**

Về thực hành tại phòng thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218).

5.2. Dịch pha loãng.

Để chuẩn bị các dung dịch pha loãng, xem TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887).

5.3. Môi trường hồi phục: Thạch glutamat khoáng cải tiến**5.3.1. Thành phần.**

Natri glutamat	6,35 g
Lactosa	10,0
Natri format	0,25 g
L(-)-xystin	0,02 g
Axit L(-) aspactic	0,024 g
L(+)-aginin	0,02 g
Thiamin	0,001 g
Axit nicotinic	0,001 g
Axit pantothenic	0,001 g
Magie sunfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,100 g
Sắt (III) amoni xitrat [tối thiểu là 15% Fe (m/m)]	0,010 g
Canxi clorua ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,010 g
Dikali hidro phosphat	0,90 g
Amoni clorua	2,5 g
Thạch	12 g đến 18 g ¹⁾
Nước	1000 ml

¹⁾ Tùy vào sức đông của thạch

5.3.2. Chuẩn bị

Hoà tan amoni clorua trong nước. Bổ sung các thành phần khác vào và đun sôi. Chính pH sao cho giá trị pH sau khi khử trùng là 6,7 ở 25°C. Chuyển vào mỗi dụng cụ chứa thích hợp (6.5) 100 ml môi trường này và khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121°C trong 10 phút.

5.3.3. Chuẩn bị các đĩa thạch

Rót vào các đĩa Petri vô trùng (6.6) từ 12 ml đến 15 ml môi trường, đã được làm nguội đến 47°C

trong nồi cách thuỷ (6.10), và để cho đông đặc lại. Các đĩa này có thể bảo quản trong vòng một tuần ở nhiệt độ từ 0°C đến + 5°C.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô các đĩa thạch này một cách cẩn thận [thí dụ: Để trong buồng sấy hoặc tủ sấy (6.4) ở 50°C], tốt nhất là mở nắp và để mặt thạch hướng xuống dưới, cho đến khi các giọt nước nhỏ trên mặt thạch biến mất. Không tiếp tục làm khô thêm.

Chú thích - Môi trường thạch cần được làm khô đủ để sao cho 1 ml dịch mẫu cấy được hấp thụ hoàn toàn lên màng/ thạch trong vòng 15 phút (xem 9.2.3).

5.4. Môi trường chọn lọc: Thạch mật trypton (Xem tham khảo [3])

5.4.1. Thành phần

Trypton (thuỷ phân pepsin của casein)	20,0 g ¹⁾
Muối mật (tinh chế)	1,5 g ²⁾
Thạch	từ 12 g đến 18 g ³⁾
Nước	1000 ml

¹⁾ Nên sử dụng các loại bán sẵn thuận lợi cho việc hình thành indol.

²⁾ Muối mật Oxoid No.3 là một thí dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra để tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tổ chức Tiêu chuẩn hoá quốc tế không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

³⁾ Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

5.4.2. Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước và đun đến sôi. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng giá trị pH là 7,2 ở 25 °C. Chuyển từng lượng 100 ml môi trường vào các dụng cụ chứa thích hợp và khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút.

5.4.3. Chuẩn bị các đĩa thạch

Rót vào các đĩa Petri vô trùng (6.6) từ 12 ml đến 15 ml môi trường, đã được làm nguội đến 47°C trong nồi cách thuỷ (6.10), và để cho đông đặc lại. Các đĩa này có thể bảo quản trong vòng 4 ngày ở nhiệt độ từ 0°C đến + 5°C.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô các đĩa thạch này một cách cẩn thận [thí dụ: Để trong buồng sấy hoặc tủ sấy (6.4) ở 50°C], tốt nhất là mở nắp và để mặt thạch hướng xuống dưới, cho đến khi các giọt nước nhỏ trên mặt thạch biến mất. Không tiếp tục làm khô thêm.

5.5. Thuốc thử phát hiện Indol (Thuốc thử Vracko và Sherris)

5.5.1. Thành phần

p - Dimethylaminobenzaldehyt	5 g
A xít clohydric c(HCl) = 1mol/l	100 ml

5.5.2. Chuẩn bị

Hoà tan thuốc thử trong axit clohydric và bảo quản ở nhiệt độ phòng không quá một tháng.

6. Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

Thiết bị thông thường của phòng thí nghiệm phân tích vi sinh và đặc biệt là:

6.1. Thiết bị khử trùng khô (tủ sấy) hoặc khử trùng ướt (nồi hấp áp lực).

Xem TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218) .

- 6.2. *Tủ ẩm*, có khả năng duy trì nhiệt độ ở $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hoặc $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 6.3. *Tủ ẩm*, có khả năng duy trì nhiệt độ ở $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- 6.4. *Buồng sấy hoặc tủ sấy*, được thông gió bằng đối lưu, có khả năng duy trì nhiệt độ ở $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 6.5. *Ống nghiệm*, có kích thước 18 mm x 180 mm và bình hoặc lọ có dung tích từ 125 ml đến 300 ml, dùng để khử trùng và bảo quản môi trường nuôi cấy.
- 6.6. *Đĩa Petri*, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo, đường kính từ 90 mm đến 100 mm.
- 6.7. *Màng xenlulo axetat*, có cỡ lỗ từ 0,45 μm đến 1,2 μm và đường kính 85 mm.
- 6.8. *Pipet*, được hiệu chuẩn để dùng cho vi sinh vật, có dung tích danh định 1 ml, được chia độ 0,1 ml và có đường kính lỗ xả từ 2 mm đến 3 mm.
- 6.9. *Que gạt*, bằng chất dẻo hoặc bằng thủy tinh, thí dụ: que gạt làm bằng đĩa thủy tinh có đường kính khoảng 3,5 mm, dài 20 cm, một đoạn đầu dài khoảng 3 cm được uốn để tạo thành góc vuông và đầu mút được làm nhẵn bằng nhiệt.
- 6.10. *Nồi cách thủy*, hoặc thiết bị tương tự, có thể duy trì nhiệt độ ở $47^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.
- 6.11. *Đèn cực tím sóng dài (365 nm)*, được gắn với bộ lọc thích hợp để loại bức xạ UV dưới 310 nm.
- 6.12. *pH-met*, chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị pH ở 25°C .

7. Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo qui định trong TCVN 4833 - 1 : 2002 (ISO 3100 - 1 [4]).

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

8. Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo tiêu chuẩn cụ thể thích hợp đối với sản phẩm có liên quan. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể thì các bên liên quan cần thỏa thuận với nhau về vấn đề này.

Phương pháp lấy mẫu được khuyến nghị nêu trong TCVN 4833 - 2 : 2002 (ISO 3100 - 2 [5]).

9. Cách tiến hành

9.1. Phân mẫu thử, huyền phù ban đầu và dịch pha loãng

Xem TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887) và tiêu chuẩn cụ thể thích hợp liên quan đến sản phẩm.

9.2. Quy trình hồi phục

9.2.1. Dùng bộ kẹp vô trùng đặt các màng xenlulô axetat (6.7) trong điều kiện vô trùng lên bề mặt đã khô của từng cặp hai đã có chứa môi trường thạch glutamat khoáng cải tiến (5.3.1), chú ý tránh tạo bọt khí ở dưới màng. Dàn phẳng các màng một cách nhẹ nhàng bằng que gạt vô trùng (6.9).

Dùng pipet vô trùng (6.8) lấy 1 ml huyền phù ban đầu cho vào chính giữa mỗi màng. Dùng que gạt vô trùng (6.9), dàn đều phần mẫu cấy lên toàn bộ bề mặt của màng, tránh không để tràn khỏi màng.

9.2.2. Dùng các pipet vô trùng khác nhau (6.8) để cấy các thể tích giống nhau của các dịch có độ pha loãng khác nhau chuẩn bị từ huyền phù ban đầu lên các màng khác nhau, như qui định trong 9.2.1.

Thời gian từ khi chuẩn bị mẫu thử (điều 8) đến khi cấy dịch lên màng không được vượt quá 45 phút, trừ khi có qui định khác trong các tiêu chuẩn có liên quan.

9.2.3. Để các đĩa đã nuôi cấy trong tư thế nằm ngang ở nhiệt độ phòng khoảng 15 phút cho đến khi

phần mẫu cấy ngập vào trong thạch. Ủ các đĩa petri trong tủ ấm (6.2) ở 35°C hoặc ở 37°C trong 4 h ± 0,5 h, để các màng/mặt thạch hướng lên trên.

9.3. *Chuyển sang môi trường chọn lọc*

9.3.1. Dùng bộ kẹp có đầu tù vô trùng chuyển các màng, với phần mẫu cấy hướng lên trên, từ môi trường thạch glutamat khoáng cải biến (5.3.1) sang môi trường thạch mật trypton (5.4).

Màng ẩm nối trên phải dính vào mặt thạch, tránh tạo bọt khí. Không sử dụng que gạt vì sẽ làm phân tán mọi khuẩn lạc có mặt, làm kết quả định lượng cao hơn giá trị thực.

9.3.2. Ủ các đĩa này từ 18 h đến 24 h trong tủ ấm (6.3) ở 44°C, các màng/mặt thạch hướng lên trên. Không chồng các đĩa lên nhau quá ba chiếc.

9.4. *Phát hiện đặc tính sinh indol của các khuẩn lạc trên màng*

9.4.1. Ghi nhãn trên nắp của mỗi đĩa để nhận biết

9.4.2. Dùng pipet lấy 2 ml thuốc thử phát hiện indol (5.5) cho vào nắp của đĩa petri lật ngược, đặt ở tư thế nằm ngang.

9.4.3. Dùng bộ kẹp vô trùng lấy màng ra khỏi mặt thạch tương ứng và cho vào thuốc thử indol. Nếu cần, phải nghiêng nắp sao cho tất cả bề mặt của màng được thấm ướt bằng thuốc thử indol. Sau 5 phút, dùng pipet loại bỏ thuốc thử còn lại.

9.4.4. Đặt màng dưới đèn cực tím (6.11) trong 30 phút. Các khuẩn lạc indol dương tính có màu hồng.

9.5. *Đếm khuẩn lạc*

Đếm các khuẩn lạc indol dương tính (màu hồng) trên các màng, tốt nhất là trên các màng có từ 15 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc màu hồng.

10. *Biểu thị kết quả*

Sử dụng chuẩn cứ sau đây để xác định số lượng E. coli có mặt.

10.1. *Phương pháp tính*

10.1.1. Nếu một hoặc cả hai màng lọc của một độ pha loãng nhất định chứa từ 15 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc màu hồng, thì tính giá trị trung bình số của số khuẩn lạc đếm được trên hai màng.

Chỉ giữ lại hai chữ số có nghĩa, tiến hành như sau:

- Nếu số đó nhỏ hơn 100, thì làm tròn đến bội số gần nhất của 5.
- Nếu số đó lớn hơn 100 và kết thúc bằng số 5, thì làm tròn số đó đến bội số gần nhất của 20;
- Nếu số đó lớn hơn 100 và tận cùng không phải là 5, thì làm tròn số đó đến bội số gần nhất của 10.

Nhân giá trị này với số nghịch đảo của độ pha loãng tương ứng thu được số E. Coli trong một gam sản phẩm. Biểu thị kết quả này dưới dạng tích của một số nằm trong khoảng 1,0 đến 9,9 với lũy thừa cơ số 10 và số mũ thích hợp.

10.1.2. Nếu có các màng chứa từ 15 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc màu hồng ở hai độ pha loãng liên tiếp, thì tính số lượng E.Coli theo qui định trong 9.3.5.1 của TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218 :1996).

10.1.3. Nếu trên các màng có ít hơn 15 khuẩn lạc màu hồng tương ứng với dịch huyền phù ban đầu, thì tính giá trị trung bình số học, y, của số các khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa.

Báo cáo kết quả thu được bằng số lượng E.coli tính trong một gam, N_E :

$$N_E = y/d.$$

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

10.1.4. Nếu trên các màng không có các khuẩn lạc màu hồng nào tương ứng với huyền phù ban đầu thì báo cáo kết quả như sau:

- Ít hơn 1/d E.Coli trong một gam

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

10.2. Giới hạn tin cậy

Để tính dải tin cậy, xem TCVN 6404: 1998 (ISO 7218: 1996).

11. Báo cáo kết quả

Bản báo cáo kết quả phải ghi rõ:

- Mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết hoàn toàn mẫu thử;
- Phương pháp lấy mẫu đã dùng, nếu biết;
- Phương pháp thử đã áp dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- Tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- Kết quả thử thu được;
- Nếu kiểm tra độ lặp lại, thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT**Phát hiện và định lượng Enterobacteriaceae không qua quá trình phục hồi - Kỹ thuật MPN và kỹ thuật đếm khuẩn lạc**

Meat and meat products - Detection and enumeration of Enterobacteriaceae without resuscitation - MPN technique and colony-count technique

TCVN 7136: 2002 hoàn toàn tương đương với ISO 5552: 1997;

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp phát hiện và định lượng *Enterobacteriaceae* có trong tất cả các loại thịt và sản phẩm thịt, kể cả thịt gia cầm. Việc định lượng được tiến hành như sau:

- Bằng cách tính số có xác suất lớn nhất (MPN) sau khi nuôi cấy ở 35°C hoặc 37°C trong môi trường lỏng; hoặc
- Bằng cách đếm số khuẩn lạc trong môi trường đặc sau khi nuôi cấy ở 35°C hoặc 37°C.

Nhiệt độ sử dụng để nuôi cấy cần được thoả thuận giữa các bên có liên quan và phải được ghi vào báo cáo thử nghiệm.

Chú thích - Đối với thực phẩm đông lạnh, nhiệt độ nuôi cấy ở 30°C là thích hợp khi mục đích định lượng mang tính chất công nghệ.

Khi số lượng vi khuẩn ít thì phương pháp MPN là thích hợp, còn đối với các trường hợp khác thì phương pháp đếm khuẩn lạc là thích hợp hơn.

Tiêu chuẩn này không bao gồm các quy trình phục hồi, do đó kết quả không cần phải liên hệ đến các chuẩn cứ hoặc các quy định kỹ thuật dựa trên giả định là quá trình phục hồi đã được thực hiện.

Điểm hạn chế khi áp dụng tiêu chuẩn này là kết quả có độ dao động lớn. Vì vậy, cần sử dụng phương pháp này và đọc kết quả theo các thông tin nêu trong 10.3.

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 4833 - 2 : 2002 (ISO 3100 - 2 : 1988) Thịt và sản phẩm thịt - Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử - Phần 2 : Chuẩn bị mẫu thử để kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887 : 1983) Vi sinh vật học - Hướng dẫn chung về cách pha chế các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218 : 1996) Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc - Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6847 : 2001 (ISO 7402 : 1993) Vi sinh vật học - Hướng dẫn chung về định lượng *Enterobacteriaceae* không qua quá trình phục hồi - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc và kỹ thuật MPN.

3. Định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng các định nghĩa sau đây:

- 3.1 Enterobacteriaceae (Enterobacteriaceae):** Các vi sinh vật lên men glucoza và cho phản ứng oxidaza âm tính khi tiến hành phép thử theo phương pháp qui định.
- 3.2 Phát hiện Enterobacteriaceae (detection of Enterobacteriaceae):** Việc xác định sự có mặt hay không có mặt của các vi khuẩn này, trong một khối lượng sản phẩm cụ thể, khi thực hiện phép thử theo tiêu chuẩn này.
- 3.3 Số đếm Enterobacteriaceae (count of Enterobacteriaceae):** Số Enterobacteriaceae tìm thấy trong một mililit hoặc trong một gam mẫu thử khi thực hiện phép thử theo phương pháp qui định.

4. Nguyên tắc

4.1. Chuẩn bị dịch pha loãng

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân từ mẫu thử.

4.2. Phát hiện Enterobacteriaceae trong một lượng qui định của mẫu thử

Cho vào ống nghiệm chứa môi trường canh thang tăng sinh chọn lọc 1ml mẫu thử, nếu sản phẩm dạng lỏng, hoặc một lượng huyền phù ban đầu (hoặc các dung dịch pha loãng thập phân của chúng), nếu các sản phẩm ở dạng khác.

Ủ các ống nghiệm này ở 35°C hoặc 37°C trong 24 h, sau đó ria cấy các dịch nuôi cấy lên thạch mật glucoza đỏ tím. Sau khi ủ các đĩa thạch đã ria cấy ở 35°C hoặc 37°C trong 24 h, lấy các khuẩn lạc nghi ngờ để thử khẳng định bằng đặc tính sinh hoá.

4.3. Định lượng Enterobacteriaceae

4.3.1. Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN)

Chú thích - Nên dùng kỹ thuật này khi số lượng Enterobacteriaceae trong một mililit hoặc trong một gam mẫu thử được dự kiến nằm trong khoảng từ 1 đến 100.

Cấy vào ba ống nghiệm chứa môi trường nồng độ kép mỗi ống một lượng mẫu thử qui định, nếu sản phẩm dạng lỏng, hoặc một lượng qui định của huyền phù ban đầu, nếu sản phẩm ở các dạng khác.

Cấy vào ba ống nghiệm chứa môi trường nồng độ đơn mỗi ống một lượng mẫu thử qui định, nếu sản phẩm dạng lỏng, hoặc một lượng qui định của huyền phù ban đầu, nếu các sản phẩm ở dạng khác. Sau đó trong cùng một điều kiện, cấy vào ba ống nghiệm chứa môi trường nồng độ đơn mỗi ống một lượng quy định dịch pha loãng thập phân thứ nhất chuẩn bị từ mẫu thử hoặc từ huyền phù ban đầu.

Ủ ấm các ống nghiệm ở 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong 24 h.

Từ số lượng các ống được thử khẳng định dương tính, tính số có xác suất lớn nhất của Enterobacteriaceae trong một mililit hoặc một gam mẫu thử bằng cách tra bảng MPN (xem phụ lục A).

4.3.2. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc

Chú thích - Nên dùng kỹ thuật này khi số lượng Enterobacteriaceae trong một mililit hoặc trong một gam mẫu thử được dự kiến lớn hơn 100.

Cấy vào hai đĩa Petri chứa môi trường thạch mật glucoza đỏ tím (kỹ thuật đổ đĩa) mỗi đĩa một lượng mẫu thử qui định, nếu sản phẩm ban đầu là chất lỏng, hoặc một lượng quy định của huyền phù ban đầu, nếu các sản phẩm ở dạng khác. Phủ lên bề mặt thạch đã cấy một lớp môi trường cùng loại.

Chuẩn bị các cặp đĩa khác trong cùng điều kiện thử nghiệm và cấy các dịch pha loãng thập phân chuẩn bị từ mẫu thử hoặc từ huyền phù ban đầu.

Ủ ấm các đĩa ở 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong 24 h $\pm$ 2 h.

Từ số các khuẩn lạc điển hình đã được thử khẳng định trên mỗi đĩa, tính số *Enterobacteriaceae* có trong một mililit hoặc trong một gam mẫu thử.

5. Dịch pha loãng, các môi trường nuôi cấy và thuốc thử

5.1. Khái quát

Đối với thực hành phòng thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218).

5.2. Dịch pha loãng

Xem TCVN 6507: 1999 (ISO 6887 : 1983).

5.3. Môi trường nuôi cấy

5.3.1. Canh thang glucoza mật lục sáng có đậm (canh thang EE).

5.3.1.1. Thành phần

	a) Môi trường nồng độ kép	b) Môi trường nồng độ đơn
Pepton	20,0g	10,0g
Glucoza	10,0g	5,0g
Dinatri hydro phosphat (Na_2HPO_4)	12,90g	6,45g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	4,0g	2,0g
Mật bò khô	40,0g	20,0g
Lục sáng	0,027g	0,0135g
Nước	1000 ml	1000 ml

5.3.1.2. Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh đã được làm khô trong nước bằng cách đun sôi. Chính pH sao cho giá trị pH sau khi đun sôi là 7,2 ở 25°C, nếu cần. Không đun nóng môi trường quá 30 phút. Làm nguội nhanh môi trường.

Chuyển vào mỗi ống nghiệm, bình hoặc chai vô trùng (6.8) 10 ml môi trường trong điều kiện vô trùng.

Không hấp môi trường bằng nồi hấp áp lực.

Môi trường này có thể bảo quản trong vòng một tuần ở nhiệt độ từ 0°C đến 5°C.

5.3.2. Thạch glucoza mật đỏ tím (VRBG)

5.3.2.1. Thành phần

Pepton	7,0g
Cao nấm men	3,0g
Muối mật	1,5g
Glucoza	10,0g

Natri clorua	5,0g
Đỏ trung tính	0,03g
Tím tinh thể	0,002g
Thạch ở dạng bột hoặc ở dạng vảy	8g đến 18g ¹⁾
Nước	1000ml

¹⁾ Phụ thuộc sức đông của thạch

5.3.2.2. Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh đã được làm khô trong nước bằng cách đun sôi. Không đun sôi môi trường quá 2 phút.

Chỉnh pH sao cho giá trị pH sau khi đun sôi là 7,4 ở 25°C, nếu cần.

Chuyển môi trường nuôi cấy này vào các ống nghiệm, bình hoặc lọ vô trùng (6.8) có dung tích không lớn hơn 500 ml.

Không hấp môi trường bằng nồi hấp áp lực

Chuẩn bị môi trường này ngay trước khi sử dụng (xem 9.3.2 và 9.4.1).

5.3.2.3. Chuẩn bị các đĩa thạch (chỉ yêu cầu đối với việc phát hiện và kỹ thuật MPN, xem 9.3.2)

Chuyển ngay khoảng 15 ml môi trường nuôi cấy, đã được làm nguội đến khoảng 47°C trong nồi cách thuỷ (6.5), vào các đĩa Petri (6.6) và để cho đông đặc.

Ngay trước khi sử dụng, sấy các đĩa trong tủ sấy (6.3) cho đến khi bề mặt của thạch khô, tốt nhất là mở nắp và để bề mặt thạch úp xuống.

Nếu được chuẩn bị trước, các đĩa chưa khô này không nên giữ quá 4 ngày ở nhiệt độ từ 0°C đến 5°C.

5.3.3. Thạch glucoza.

5.3.3.1. Thành phần

Trypton	10,0g
Cao nấm men	1,5g
Glucoza	10,0g
Natri clorua	5,0g
Bromcresol tía	0,015g
Thạch ở dạng bột hoặc vảy	8g đến 18g ¹⁾
Nước	1000ml

¹⁾ Phụ thuộc sức đông của thạch

5.3.3.2. Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh đã được làm khô trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần.

Chỉnh pH sao cho giá trị pH sau khi khử trùng là 7,0 ở 25°C, nếu cần.

Chuyển vào mỗi ống nghiệm hoặc bình (6.8) 15 ml môi trường nuôi cấy.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121°C.

Để các ống nghiệm hoặc các bình ở vị trí thẳng đứng.

Môi trường này có thể bảo quản trong vòng một tuần ở 0°C đến 5°C.

Ngay trước khi sử dụng, hâm nóng môi trường bằng cách ngâm trong nước sôi hoặc bằng luồng hơi nước trong 15 phút, sau đó làm nguội nhanh đến nhiệt độ nuôi cấy.

5.3.4. Thạch dinh dưỡng

5.3.4.1. Thành phần

Cao thịt bò	3,0g
Pepton	5,0g
Thạch ở dạng bột hoặc vảy	8g đến 18g ¹⁾
Nước	1000ml

¹⁾ Phụ thuộc sức đông của thạch

5.3.4.2. Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh đã được làm khô trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần.

Chỉnh pH sao cho giá trị pH sau khi khử trùng là 7,0 ở 25°C, nếu cần.

Chuyển môi trường nuôi cấy vào các ống nghiệm, chai hoặc bình (6.8) có dung tích không lớn hơn 500 ml.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6. 1) ở 121°C.

5.3.4.3. Chuẩn bị các đĩa thạch (xem 9.4.1)

Chuyển ngay khoảng 15 ml môi trường nuôi cấy, đã được làm tan chảy và làm nguội đến khoảng 47°C vào các đĩa Petri (6.6) và để cho đông đặc.

Ngay trước khi sử dụng, sấy các đĩa trong tủ sấy (6.3) cho đến khi bề mặt của thạch khô, tốt nhất là mở nắp và để bề mặt thạch úp xuống.

Nếu được chuẩn bị trước, các đĩa thạch chưa khô này có thể bảo quản trong vòng 2 tuần ở nhiệt độ từ 0°C đến 5°C

5.4. Thuốc thử oxidaza

5.4.1. Thành phần

N,N,N',N'-Tetrametyl-p -phenylendiamin dihydro clorua	1,0g
Nước	100ml

5.4.2. Chuẩn bị

Hoà tan thuốc thử trong nước lạnh. Chuẩn bị thuốc thử ngay trước khi sử dụng.

6. Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thí nghiệm phân tích vi sinh thông thường và đặc biệt là:

6.1. Thiết bị khử trùng khô (tủ sấy) hoặc khử trùng ướt (nồi hấp áp lực)

Xem TCVN 6404 :1998 (ISO 7218).

6.2. Tủ ấm, có khả năng hoạt động ở 35°C ± 1°C hoặc 37°C ± 1°C.

6.3. Tủ sấy hoặc tủ ấm, có khả năng hoạt động ở 35°C ± 1°C và 55°C ± 1°C.

6.4. pH-met, có độ chính xác đến ± 0,1 đơn vị pH ở 25°C.

- 6.5. Nồi cách thủy**, hoặc thiết bị tương tự, có khả năng hoạt động ở $47^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- 6.6. Đĩa Petri**, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo có đường kính từ 90 mm đến 100 mm.
- 6.7. Que cấy vòng**, bằng platin/iridi, niken/crom hoặc bằng chất dẻo sử dụng một lần có đường kính khoảng 3 mm, que cấy đầu thẳng làm bằng vật liệu cùng loại hoặc đĩa thủy tinh.
- Chú thích* - Que cấy vòng niken/crom không thích hợp cho phép thử oxidaza (xem 9.5.2.1).
- 6.8. Ống nghiệm**, có kích thước khoảng 16 mm x 160 mm và 20 mm x 200 mm và các bình hoặc chai có dung tích từ 150 ml đến 500 ml.
- 6.9. Pipet chia độ xả hết**, dung tích danh định từ 1 ml và 10 ml, được chia độ tương ứng đến 0,1 ml và 0,5 ml.

7. Lấy mẫu

Phương pháp lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 4833 - 1 : 2002 (ISO 3100 - 1)^[1].

Điều quan trọng là phòng thí nghiệm nhận được mẫu thực sự đại diện và không bị hư hỏng hay biến đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

8. Chuẩn bị mẫu thử

Lấy mẫu đại diện theo phương pháp qui định trong TCVN 4833 - 2 : 2002 (ISO 3100 - 2). Tiến hành thử nghiệm mẫu đã xử lý càng nhanh càng tốt. Nếu cần bảo quản thì phải giữ ở nhiệt độ từ 0°C đến $+2^{\circ}\text{C}$ nhưng không quá 24 h.

9. Cách tiến hành

9.1. Phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và dịch pha loãng

Xem TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887).

Chuẩn bị các loạt dung dịch pha loãng thập phân riêng lẻ từ mẫu thử, nếu sản phẩm ở dạng lỏng, hoặc từ huyền phù ban đầu, nếu các sản phẩm ở dạng khác.

9.2. Phát hiện

Chú thích - Phép thử kiểm tra sự có/không có này thường được tiến hành ba lần.

9.2.1. Cấy và ủ

Dùng pipet vô trùng (6.9) chuyển vào ống nghiệm chứa môi trường canh thang glucoza mật lục sáng có đệm (5.3.1) 1 ml phần mẫu thử, nếu sản phẩm ở dạng lỏng, hoặc huyền phù ban đầu, nếu sản phẩm ở dạng khác (9.1), hoặc 1 ml phần mẫu thử của một trong hai độ pha loãng 10^{-2} hoặc 10^{-3} từ hai loạt dung dịch pha loãng. Ủ ống nghiệm này ở nhiệt độ từ 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong $24 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$.

9.2.2. Phân lập

Ria cấy một que cấy vòng (6.7) dịch nuôi cấy đã ủ (xem 9.2.1) lên đĩa thạch glucoza mật đỏ tím (xem 5.3.2.3) và ủ đĩa này ở nhiệt độ từ 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong $24 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$.

9.2.3. Chọn khuẩn lạc để thử khẳng định

Từ đĩa đã được ủ theo 9.2.2 mà trên đó có các khuẩn lạc có màu hồng đến màu đỏ đặc trưng (có hoặc không có quang tử) hoặc có các khuẩn lạc có màng nhầy không màu phát triển, chọn một cách ngẫu nhiên năm khuẩn lạc như vậy để thử khẳng định đặc tính sinh hoá (xem 9.5.2) sau khi cấy truyền (xem 9.5.1).

9.3. Kỹ thuật MPN

9.3.1. Cấy và ủ

Lấy ba ống nghiệm chứa môi trường canh thang EE nồng độ kép [5.3.1.1 a)]. Dùng pipet (6.9) chuyển vào mỗi ống 10 ml mẫu thử, nếu sản phẩm dạng lỏng, hoặc 10 ml huyền phù ban đầu, nếu các sản phẩm ở dạng khác.

Lấy ba ống nghiệm chứa môi trường canh thang EE nồng độ đơn [5.3.1.1 b)]. Dùng pipet (6.9) khác cho vào mỗi ống 1 ml mẫu thử, nếu sản phẩm dạng lỏng, hoặc 1 ml huyền phù ban đầu, nếu các sản phẩm ở dạng khác.

Lấy thêm ba ống nghiệm chứa môi trường canh thang EE nồng độ đơn [5.3.1.1 b)]. Dùng Pipet (6.9) khác cho vào mỗi ống 1 ml dung dịch pha loãng thập phân thứ nhất (10^{-1}) của mẫu thử, nếu sản phẩm dạng lỏng, hoặc 1 ml dung dịch pha loãng thập phân thứ nhất của huyền phù ban đầu (10^{-2}), nếu sản phẩm ở dạng khác.

Ủ chín ống này ở nhiệt độ 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong $24\text{ h} \pm 4\text{ h}$.

9.3.2. Phân lập

Ria cấy một que cấy vòng (6.7) dịch nuôi cấy từ mỗi ống trong chín ống đã ủ (xem 9.3.1) lên các đĩa thạch glucoza mật đỏ tím (xem 5.3.2.3) và ủ các đĩa này ở nhiệt độ 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong $24\text{ h} \pm 4\text{ h}$.

9.3.3. Chọn các khuẩn lạc để thử kháng định

Từ mỗi đĩa đã được ủ ấm theo 9.3.2 mà trên đó có các khuẩn lạc có màu hồng đến màu đỏ đặc trung (có hoặc không có quang tử) hoặc có các khuẩn lạc có màng nhầy không màu phát triển, chọn một cách ngẫu nhiên năm khuẩn lạc như vậy để thử kháng định đặc tính sinh hoá (xem 9.5.2) sau khi cấy truyền (xem 9.5.1).

9.4. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc

9.4.1. Cấy và ủ

9.4.1.1. Lấy hai đĩa petri vô trùng (6.6). Dùng pipet vô trùng (6.9) chuyển vào mỗi đĩa 1 ml mẫu thử, nếu sản phẩm dạng lỏng, hoặc 1 ml huyền phù ban đầu, nếu sản phẩm ở dạng khác.

Lấy hai đĩa petri vô trùng khác. Dùng một pipet mới vô trùng chuyển vào mỗi đĩa 1 ml dung dịch pha loãng thập phân thứ nhất (10^{-1}) của mẫu thử, nếu sản phẩm dạng chất lỏng, hoặc 1 ml dịch pha loãng thập phân thứ nhất của huyền phù ban đầu (10^{-2}), nếu sản phẩm ở dạng khác.

Lập lại trình tự trên với các độ pha loãng tiếp theo và dùng các pipet vô trùng mới cho mỗi độ pha loãng thập phân.

9.4.1.2. Rót vào mỗi đĩa petri khoảng 15 ml môi trường VRBG (5.3.2) đã chuẩn bị và được làm nguội đến khoảng 47°C trong nồi cách thuỷ (6.5). Thời gian tính từ khi chuẩn bị xong huyền phù ban đầu (hoặc độ pha loãng 10^{-1} nếu sản phẩm dạng lỏng) đến khi môi trường (5.3.2) được rót vào các đĩa không được vượt quá 15 phút.

Trộn cẩn thận mẫu cấy vào môi trường bằng cách lắc ngang và để cho hỗn hợp đông đặc lại, đặt các đĩa petri ở chỗ mát, trên mặt phẳng nằm ngang.

9.4.1.3. Sau khi hỗn hợp đông đặc hoàn toàn, phủ lên bề mặt một lớp từ 6 ml đến 10 ml môi trường VRBG (5.3.2) đã được chuẩn bị và làm nguội như mô tả trong 9.4.1.2, để tránh vi khuẩn mọc lan và có được điều kiện bán yếm khí. Để cho lớp bề mặt đông đặc như mô tả ở trên.

9.4.1.4. Lật ngược các đĩa đã chuẩn bị và ủ ấm ở 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong $24\text{ h} \pm 4\text{ h}$.

9.4.2. Chọn và đếm các khuẩn lạc

Chọn các đĩa (9.4.1.4) có chứa ít hơn 150 khuẩn lạc đặc trung (xem 9.3.3) có đường kính 0,5 mm hoặc lớn hơn; đếm các khuẩn lạc nghi ngờ này. Chọn ngẫu nhiên năm khuẩn lạc như vậy từ mỗi đĩa để thử kháng định đặc tính sinh hoá (xem 9.5.2) sau khi cấy truyền (xem 9.5.1).

Loại bỏ phép xác định nếu một nửa hoặc trên một nửa diện tích bề mặt của đĩa có khuẩn lạc mọc quá dày. Nếu diện tích vùng có khuẩn lạc mọc quá dày nhỏ hơn một nửa diện tích bề mặt của đĩa, thì đếm các khuẩn lạc trên phần nhìn rõ và ngoại suy để có được số lượng tương ứng với tổng diện tích bề mặt của đĩa.

9.5. Thử kháng định

9.5.1. Cây truyền

Ria cây lên các đĩa thạch dinh dưỡng (5.3.4) từng khuẩn lạc đã được chọn để thử kháng định (xem 9.2.3, 9.3.3 và 9.4.2).

Ủ các đĩa này ở nhiệt độ 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong 24 h $\pm$ 2 h. Chọn khuẩn lạc tách biệt từ các đĩa đã ủ để thử kháng định đặc tính sinh hoá (xem 9.5.2).

9.5.2. Thử kháng định đặc tính sinh hoá

9.5.2.1. Phản ứng oxidaza

Dùng que cấy vòng hoặc que cấy đầu thẳng bằng platin/iridi hoặc dũa thuỷ tinh (6.7), lấy một phần từ mỗi khuẩn lạc tách biệt (9.5.1) và ria cây lên giấy lọc đã được tẩm thuốc thử oxidaza (5.4) hoặc ria lên các đĩa chứa môi trường chỉ thị bán sẵn. Không dùng que cấy vòng hoặc que cấy đầu thẳng bằng niken/crom.

Phép thử được coi là âm tính khi màu của tấm giấy lọc đó không chuyển sang màu tối trong vòng 10 giây.

Đối với các đĩa chứa môi trường chỉ thị bán sẵn, cần theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

9.5.2.2. Phép thử lên men

Dùng que cấy đầu thẳng (6.7) cấy các khuẩn lạc đã được chọn ở 9.5.1 vào các ống nghiệm chứa môi trường thạch glucoza (5.3.3). Ủ các ống này ở nhiệt độ 35°C hoặc 37°C trong 24 h $\pm$ 2 h (theo thoả thuận).

Phản ứng được coi là dương tính nếu màu vàng lan khắp ống thạch. Hầu hết các chủng *Enterobacteriaceae* đều sinh khí.

10. Biểu thị kết quả

10.1. Phát hiện *Enterobacteriaceae* trong một lượng mẫu qui định

10.1.1. Nếu các ống chứa các khuẩn lạc được thử kháng định là *Enterobacteriaceae* (xem 10.2.2), thì báo cáo kết quả như sau:

"*Enterobacteriaceae* được phát hiện trong lượng mẫu qui định".

10.1.2. Nếu các ống (9.2) không chứa các khuẩn lạc *Enterobacteriaceae* (xem 10.2.2) thì báo cáo kết quả như sau:

"Không phát hiện thấy *Enterobacteriaceae* trong lượng mẫu qui định".

10.2. Tính số xác suất lớn nhất (MPN)

10.2.1. Đếm số ống cho phản ứng dương tính đối với mỗi độ pha loãng.

10.2.2. Nếu một trong những khuẩn lạc đặc trưng được chọn (9.3.3) từ đĩa cấy truyền (xem 9.5.1) có phản ứng oxidaza âm tính và glucoza dương tính, thì ống nghiệm chứa mẫu cấy truyền đó được coi là dương tính.

10.2.3. Từ số ống dương tính của các độ pha loãng khác nhau, tra bảng MPN (xem phụ lục A) để xác định chỉ số xác suất lớn nhất (MPN).

10.2.4. Đối với các sản phẩm dạng lỏng, số *Enterobacteriaceae* trong một mililit được tính bằng cách chia chỉ số MPN cho 10. Đối với các sản phẩm ở dạng khác mà từ đó huyền phù ban đầu được

chuẩn bị, thì số khuẩn lạc trong một gam sẽ bằng chỉ số MPN.

10.3. *Tính số đếm khuẩn lạc*

10.3.1. Khái quát

Nếu có ít nhất 80% các khuẩn lạc đặc trưng được chọn (xem 9.4.2) có phản ứng oxidaza âm tính và glucoza dương tính và được thử khẳng định là Enterobacteriaceae, thì số vi sinh vật có mặt sẽ bằng số đếm như ở 9.4.2.

Trong tất cả các trường hợp khác, số khuẩn lạc được tính từ tỷ lệ phần trăm số khuẩn lạc oxidaza âm tính và glucoza dương tính của tổng số các khuẩn lạc được chọn (xem 9.4.2).

Làm tròn kết quả số khuẩn lạc tính toán thành số nguyên.

10.3.2. Trường hợp chung

Tính số Enterobacteriaceae, N, trong một mililit hoặc trong một gam sản phẩm bằng công thức sau:

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

Trong đó

$\sum a$ là tổng số khuẩn lạc đếm được sau khi nhận dạng ở tất cả các đĩa giữ lại;

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

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

d là hệ số pha loãng ứng với dịch pha loãng thứ nhất.

Làm tròn kết quả đến hai chữ số có nghĩa.

Lấy kết quả là số vi sinh vật trong một mililit hoặc trong một gam sản phẩm, được biểu thị bằng tích của một số nằm trong khoảng từ 1,0 đến 9,9 với lũy thừa của cơ số 10 có số mũ thích hợp.

Thí dụ:

Đếm trực tiếp các vi sinh vật cho kết quả sau:

- Ở dịch pha loãng thứ nhất được giữ lại (10^{-3}): 66 và 80 khuẩn lạc;
- Ở dịch pha loãng thứ hai (10^{-4}): 4 và 7 khuẩn lạc;

Các số sau đây được xem xét:

- Đối với 66 khuẩn lạc: 5 khuẩn lạc, có 4 trong số này phù hợp với tiêu chuẩn cứ, $a = 53$
- Đối với 80 khuẩn lạc: 5 khuẩn lạc, có 3 trong số này phù hợp với chuẩn cứ, $a = 48$;
- Đối với 7 khuẩn lạc: 5 khuẩn lạc, có 4 trong số này phù hợp với chuẩn cứ, $a=6$;
- Đối với 4 khuẩn lạc: tất cả 4 được tìm thấy cũng là số vi sinh vật cần tìm.

Do đó

$$N = \frac{\sum a}{(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{53 + 48 + 6 + 4}{(2 + 0,2) \times 10^{-3}} = \frac{111}{2,2 \times 10^{-3}} = 50455$$

Làm tròn kết quả theo qui định ở trên và kết quả là 50 000 hoặc $5,0 \times 10^4$ Enterobacteriaceae trong một mililit hoặc một gam sản phẩm.

10.3.3. Ước tính đối với số lượng nhỏ

Nếu hai đĩa ứng với mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (các sản phẩm ở dạng khác) đều chứa ít hơn 15 khuẩn lạc thì tính giá trị trung bình số học, y , từ các khuẩn lạc đếm được trên cả hai đĩa.

Biểu thị kết quả như sau:

- Sản phẩm dạng lỏng: Số ước tính Enterobacteriaceae trong một mililít, $N_E = y$
- Các sản phẩm ở dạng khác: Số ước tính Enterobacteriaceae trong một gam, $N_E = y/d$

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

10.3.4. Trường hợp không có khuẩn lạc đặc trưng

Nếu hai đĩa ứng với mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (các sản phẩm ở dạng khác) không có các khuẩn lạc đặc trưng, biểu thị kết quả như sau:

- Nhỏ hơn 1 vi sinh vật trong một mililít (sản phẩm dạng lỏng):
- Nhỏ hơn $1 \times d^{-1}$ vi sinh vật trong một gam (các sản phẩm ở dạng khác),

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

10.4. Độ chum

10.4.1. Kỹ thuật MPN

Thực tế cho thấy, kỹ thuật MPN có kết quả dao động rất lớn. Vì vậy sử dụng kết quả theo phương pháp này phải hết sức cẩn thận. Giới hạn tin cậy được nêu ở phụ lục A.

10.4.2. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc

Xét riêng về mặt thống kê, trong 95% các trường hợp giới hạn tin cậy của kỹ thuật đếm khuẩn lạc dao động từ $\pm 16\%$ đến $\pm 52\%$ (xem tài liệu tham khảo [2]), đối với số đếm ít hơn 15 khuẩn lạc trong một đĩa giới hạn tin cậy cho ở phụ lục B. Trên thực tế, có thể gặp phải dao động thậm chí còn lớn hơn, đặc biệt giữa các kết quả nhận được từ các nhân viên thử nghiệm khác nhau.

11. Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm cần nêu rõ phương pháp đã sử dụng, nhiệt độ ủ và kết quả nhận được. Báo cáo thử nghiệm cũng cần phải đề cập đến mọi thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này và các điều được coi là không bắt buộc cũng như các sự cố có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.

PHỤ LỤC A

(Quy định)

XÁC ĐỊNH SỐ CÓ XÁC SUẤT LỚN NHẤT

Xem bảng A.1 và bảng A.2.

Bảng A.1 - Chỉ số MPN và giới hạn tin cậy

Số kết quả dương tính			Chỉ số ¹⁾ MPN	Cấp hạng ²⁾ khi số mẫu được thử					Giới hạn tin cậy ³⁾			
				1	2	3	5	10	≥95%		≥99%	
0	0	0	<0,30						0,00	0,94	0,00	1,40
0	0	1	0,30	3	2	2	2	1	0,01	0,95	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	1	1	1	1	0,01	1,00	0,00	1,60
0	1	1	0,61	0	3	3	3	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0	2	0	0,62	3	2	2	2	1	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0	0,94	0	0	0	0	3	0,35	3,5	0,18	4,60
1	0	0	0,36	1	1	1	1	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	0	1	0,72	2	2	1	1	1	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	2	1,1	0	0	0	3	3	0,4	3,5	0,2	4,6
1	1	0	0,74	1	1	1	1	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,1	3	3	2	2	2	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	0	1,1	2	2	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	1	1,5	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
1	3	0	1,6	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
2	0	0	0,92	1	1	1	1	1	0,15	3,5	0,07	4,6
2	0	1	1,4	2	1	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
2	0	2	2,0	0	3	3	3	3	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	0	1,5	1	1	1	1	1	0,4	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	2	2	1	1	1	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	2	2,7	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	0	2,1	1	1	1	1	1	0,5	4,0	0,2	5,6
2	2	1	2,8	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	2	3,5	0	0	0	0	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	0	2,9	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	1	3,6	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
3	0	0	2,3	1	1	1	1	1	0,5	9,4	0,3	14,2
3	0	1	3,8	1	1	1	1	1	0,9	10,4	0,5	15,7
3	0	2	6,4	3	3	2	2	2	1,6	18,1	1,0	25,0
3	1	0	4,3	1	1	1	1	1	0,9	18,1	0,5	25,0
3	1	1	7,5	1	1	1	1	1	1,7	19,9	1,1	27,0
3	1	2	12	3	2	2	2	1	3	36	2	44
3	1	3	16	0	0	0	3	3	3	38	2	52
3	2	0	9,3	1	1	1	1	1	1,8	36,0	1,2	43,0
3	2	1	15	1	1	1	1	1	3	38	2	52
3	2	2	21	2	1	1	1	1	3	40	2	56
3	2	3	29	3	3	3	2	2	9	99	5	152
3	3	0	24	1	1	1	1	1	54	99	3	152
3	3	1	46	1	1	1	1	1	9	198	5	283
3	3	2	110	1	1	1	1	1	20	400	10	570
3	3	3	>110									

¹⁾ Xem tài liệu tham khảo [3]

²⁾ Xem bảng A.2.

³⁾ Giới hạn tin cậy cho trong bảng này chỉ là giá trị trung bình nhằm cung cấp một số ý tưởng về ảnh hưởng của sai lệch thống kê đối với các kết quả, ngoài ra còn có những nguồn sai lệch khác mà đôi khi còn quan trọng hơn.

Bảng A.2- Các cấp hạng

Cấp hạng¹⁾	Định nghĩa
1	Khi số lượng vi khuẩn trong mẫu bằng số MPN được tìm thấy, thì kết quả nằm trong số có khả năng cao nhất thu được. Hầu như chỉ có 5% khả năng thu được kết quả nhỏ hơn giá trị nhỏ nhất ở cấp hạng này.
2	Khi số lượng vi khuẩn trong mẫu thử bằng số MPN tìm được, thì kết quả là một trong số khả năng thu được ít hơn cả số có khả năng xảy ra nhỏ nhất trong cấp hạng 1, nhưng tối đa chỉ có 1 % khả năng thu được một kết quả có thể thấp hơn kết quả nhỏ nhất có thể xảy ra ở cấp hạng này.
3	Khi số lượng vi khuẩn trong mẫu thử bằng số MPN tìm được, thì kết quả là một trong số có khả năng thu được ít hơn cả giá trị nhỏ nhất trong cấp hạng 2, nhưng tối đa chỉ có 0,1% khả năng thu được một kết quả có thể nhỏ hơn giá trị nhỏ nhất ở cấp hạng này.
0	Khi số lượng vi khuẩn trong mẫu thử bằng số MPN tìm được, thì kết quả là một trong số có khả năng thu được ít hơn cả giá trị nhỏ nhất trong cấp hạng 3. Chỉ có 0,1% khả năng thu được một kết quả ở cấp hạng này, nếu như không có một sai sót nào.

¹⁾ Trước khi bắt đầu thử cần phải quyết định chọn cấp hạng nào, tức là chỉ có cấp hạng 1, 1 và 2 hoặc thậm chí 1, 2 và 3. Việc quyết định cơ sở để chọn kết quả là rất quan trọng, chỉ kết quả cấp hạng 1 hoặc hầu hết cấp hạng 1 và 2 được chấp nhận. Kết quả cấp hạng 0 được coi là đáng nghi ngờ nhất.

PHỤ LỤC B
(Quy định)

GIỚI HẠN TIN CẬY ĐỐI VỚI ƯỚC TÍNH SỐ LƯỢNG NHỎ KHUẨN LẠC

Giới hạn tin cậy ở mức 95% đối với số khuẩn lạc được giữ lại ước tính nhỏ hơn 15 được cho ở bảng B.1

Bảng B.1 - Các giới hạn tin cậy

Số lượng vi sinh vật	Giới hạn tin cậy ở mức 95%	
	Dưới	Trên
1	<1	2
2	<1	4
3	<1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

PHỤ LỤC C
(Tham khảo)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] TCVN 4833-1: 2002 (ISO 3100-1 : 1991) Thịt và sản phẩm thịt - Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử - Phần 1 : Lấy mẫu.
[2] Cowell N.D and Moriseti M.D., J. Sci. Fd Agric., 20, 1969, p. 573.
[3] De Man, J.C., J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 17, 1983, pp. 301 - 305.

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT

Định lượng nấm men và nấm mốc - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc

Meat and meat products - Enumeration of yeasts and moulds - Colony-count technique

TCVN 7137: 2002 hoàn toàn tương đương với ISO 13681: 1995;

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc có trong tất cả các loại thịt và sản phẩm thịt, kể cả thịt gia cầm, bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 20°C đến 25°C.

Chú ý - TCVN 4993 - 89 (ISO 7954) [1] khuyến cáo rằng cloramphenicol hoặc oxytetracyclin là chất kháng sinh. Tuy nhiên, các chất kháng sinh được khuyến cáo này không đủ để kìm hãm các vi khuẩn gram âm xuất hiện trong thịt, đặc biệt là trong thịt nguyên liệu. Trong các trường hợp bị nhiễm khuẩn nặng, cần bổ sung gentamixin để nhận được sự ức chế cần thiết. Vì sự kết hợp của cloramphenicol và gentamixin kìm hãm được một số loài nấm men nhất định, nên kháng sinh oxitetraxiclin là một kháng sinh được lựa chọn.

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218) Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn gia súc - Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887 : 1983) Vi sinh vật học - Hướng dẫn chung để chuẩn bị các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 4833 - 2 : 2002 (ISO 3100 - 2 : 1988) Thịt và sản phẩm thịt - Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử - Phần 2 : Chuẩn bị mẫu thử để kiểm tra vi sinh vật.

3. Định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa sau:

3.1. Nấm men và nấm mốc (yeasts and moulds): Các vi sinh vật tạo thành các khuẩn lạc trong vòng 5 ngày ở nhiệt độ từ 20°C đến 25°C trong các điều kiện qui định trong tiêu chuẩn này.

4. Nguyên tắc

4.1. Cấy sâu trong các đĩa thạch, sử dụng môi trường nuôi cấy chọn lọc chứa trong các đĩa petri, với mẫu cấy là một lượng mẫu thử qui định, nếu sản phẩm ban đầu dạng lỏng, hoặc một lượng dung dịch huyền phù ban đầu, nếu sản phẩm ở dạng khác.

Cấy trên các đĩa khác trong cùng một điều kiện, sử dụng các độ pha loãng thập phân của huyền phù ban đầu.

Chú thích 1 - Nếu cần, để phân biệt giữa nấm men và nấm mốc, thì nên sử dụng cách nuôi cấy bề mặt đĩa thạch. Cũng nên sử dụng phương pháp nuôi cấy bề mặt khi dự kiến là có các nấm men hoặc nấm mốc mẫn cảm với nhiệt.

- 4.2. Ủ các đĩa chứa các mẫu cấy trên trong điều kiện hiếu khí ở nhiệt độ từ 20°C đến 25°C trong 3 ngày, 4 ngày hoặc 5 ngày.
- 4.3. Tính số lượng nấm men và nấm mốc có trong một gam hoặc một mililit mẫu từ số khuẩn lạc thu được trên các đĩa đã chọn ở các mức pha loãng cho kết quả có ý nghĩa.

5. Dung dịch pha loãng, môi trường nuôi cấy và thuốc thử

5.1. Khái quát

Đối với thực hành phòng thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 :1998 (ISO 7218).

5.2. Dung dịch pha loãng

Xem TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887).

5.3. Môi trường thạch của cao nấm men, glucoza và oxitetraoxyclin/gentamixin

5.3.1. Môi trường cơ sở

5.3.1.1. Thành phần

Cao men	5 g
Glucoza (C ₆ H ₁₂ O ₆)	20 g
Thạch	từ 8 đến 18 g ¹⁾
Nước	1000 ml
¹⁾ Tùy vào sức đông của thạch	

5.3.1.2 Chuẩn bị

- Hoà tan các thành phần trên vào nước bằng cách đun sôi.
- Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là 6,6 ở 25°C, nếu cần.
- Chuyển môi trường vào các vật chứa thích hợp (6.6).
- Khử trùng 10 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 115°C .

5.3.2. Dung dịch oxytetraoxyclin

5.3.2.1. Thành phần

Oxytetraoxyclin (C ₂₂ H ₃₀ N ₂ O ₄)	50 mg
Nước	25 ml

5.3.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan oxytetraoxyclin trong nước và lọc để khử trùng dung dịch.

5.3.3. Dung dịch gentamixin

5.3.3.1. Thành phần

Gentamixin	25 mg ¹⁾
Nước	25 ml
¹⁾ Theo qui định của nhà sản xuất về hàm lượng gentamixin thực của bột.	

5.3.3.2. Chuẩn bị

Hoà tan gentamixin vào nước và lọc để khử trùng dung dịch.

5.3.4. Môi trường hoàn chỉnh

Cho 5 ml dung dịch oxitettraxilin (5.3.2) và 5 ml dung dịch gentamixin (5.3.3) vào mỗi phần 100 ml môi trường cơ sở vô trùng (5.3.1), đã được làm tan chảy và giữ trong nồi cách thủy (6.4) để ở 47°C.

6. Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Chú thích 2 - Có thể dùng dụng cụ sử dụng một lần để thay thế cho các dụng cụ thủy tinh nếu nó có các đặc tính kỹ thuật phù hợp.

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm vi sinh thông thường và đặc biệt là:

6.1. Thiết bị khử trùng khô (tủ sấy) hoặc khử trùng ướt (nồi hấp áp lực)

Nồi hấp áp lực có thể hoạt động riêng rẽ hoặc là một phần của thiết bị chung để chuẩn bị và phân phối môi trường.

Xem TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218).

6.2. Máy trộn, có khả năng trộn 1 ml hoặc 2 ml mẫu với 9 ml hoặc 18 ml dịch pha loãng trong một ống nghiệm có kích thước thích hợp, để thu được huyền phù đồng nhất và máy hoạt động theo nguyên tắc quay quanh tâm của lượng chứa trong ống.**6.3. Tủ ấm**, có khả năng hoạt động ở nhiệt độ từ 20°C ± 1°C đến 25°C ± 1°C.**6.4. Nồi cách thủy**, có khả năng hoạt động ở nhiệt độ 47 °C ± 2 °C.**6.5. pH-met**, có độ chính xác trong khoảng ± 0,1 đơn vị pH ở 25°C.**6.6. Chai hoặc bình cấy mẫu**

Có thể sử dụng chai hoặc bình có nắp xoáy bằng kim loại không độc.

6.7. Pipet chia độ, đã hiệu chỉnh để dùng cho xác định vi khuẩn, có dung tích danh định 10 ml và 1 ml, được chia vạch 0,5 ml và 0,1 ml tương ứng và lỗ thoát có đường kính danh định từ 2 mm đến 3 mm.**6.8. Đĩa Petri**, đường kính từ 90 mm đến 100 mm.**7. Lấy mẫu**

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

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 4833 - 1 : 2002 (ISO 3100 - 1) [2].

8. Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 4833 - 2 : 2002 (ISO 3100 - 2).

Tiến hành kiểm tra mẫu đã xử lý càng sớm càng tốt. Nếu cần có thể bảo quản mẫu ở nhiệt độ từ 0°C đến +2°C, nhưng không quá 24 h.

9. Cách tiến hành**9.1. Phân mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng**

Chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng theo TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887).

9.2. Cấy và ủ

9.2.1. Lấy hai đĩa Petri vô trùng (6.8). Dùng pipet vô trùng (6.7) chuyển vào mỗi đĩa 1 ml mẫu thử nếu mẫu dạng lỏng hoặc 1 ml huyền phù ban đầu nếu mẫu ở dạng khác.

9.2.2. Lập lại qui trình mô tả trong 9.2.1 với các độ pha loãng khác.

9.2.3. Từ chai cấy mẫu (6.6) rót vào mỗi đĩa Petri khoảng 15 ml môi trường thạch của cao men, glucoza và oxitetraxin/gentamixin (5.3), đã tan chảy và được giữ ở 47°C trong nồi cách thủy (6.4). Thời gian từ khi kết thúc chuẩn bị mẫu thử đến thời điểm môi trường được rót sang đĩa không quá 15 phút.

Trộn mẫu cấy một cách cẩn thận với môi trường và cho hỗn hợp đông đặc lại bằng cách để các đĩa Petri trên bề mặt phẳng mát nằm ngang.

9.2.4. Lật ngược các đĩa và đặt chúng vào tủ ấm (6.3) để ở nhiệt độ từ 20°C đến 25°C.

9.3. Đếm và chọn các khuẩn lạc

Đếm các khuẩn lạc trên mỗi đĩa sau 3 ngày, 4 ngày và 5 ngày ủ ấm. Sau 5 ngày, giữ lại các đĩa chứa ít hơn 150 khuẩn lạc. Nếu trên các đĩa quá nhiều nấm mốc hoặc khó có thể đếm các khuẩn lạc tách biệt thì ghi lại các số đếm được sau 4 ngày (thậm chí sau 3 ngày) ủ ấm. Khi đó trong báo cáo thử nghiệm nêu rõ thời gian ủ là 3 ngày hoặc 4 ngày.

Nếu cần, tiến hành kiểm tra bằng kính hiển vi để phân biệt các khuẩn lạc nấm men và nấm mốc với các khuẩn lạc của vi khuẩn có kích thước nhỏ.

10. Biểu thị kết quả**10.1. Trường hợp chung**

Sử dụng các đĩa chứa ít hơn 150 khuẩn lạc (xem 9.3).

Tính số lượng vi sinh vật trong một gam hoặc một mililit sản phẩm, N, theo công thức sau:

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

Trong đó

$\sum C$ - là tổng số các khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại;

n_1 - là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng đầu tiên;

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

d - là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất được giữ lại (tức là có nồng độ mẫu thử cao hơn).

Làm tròn các kết quả tính được đến hai chữ số có nghĩa. Như vậy, nếu chữ số sau cùng nhỏ hơn 5 thì số đứng trước số đó không bị thay đổi, còn nếu chữ số sau cùng là 5 hoặc nhỏ hơn 5 thì tăng số đứng trước lên một đơn vị.

Làm tròn tiếp theo cho đến khi thu được hai chữ số có nghĩa.

Lấy kết quả là số lượng vi sinh vật trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong một gam (sản phẩm dạng khác), được biểu thị bằng số từ 1,0 đến 9,9 nhân với lũy thừa tương ứng của 10.

Thí dụ:

Số đếm trực tiếp của nấm men và nấm mốc cho các kết quả sau (hai đĩa Petri cho mỗi độ pha loãng đã được ủ):

- Ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}): 83 khuẩn lạc và 97 khuẩn lạc;

- Ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) : 33 khuẩn lạc và 28 khuẩn lạc.

Như vậy:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{83+97+33+28}{[2(0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{241}{0,022} = 10954$$

Làm tròn các kết quả như quy định trên ta có 11000 hoặc $1,1 \times 10^4$ nấm men hoặc nấm mốc trong một mililit hoặc một gam sản phẩm.

10.2. Ước tính các số lượng nhỏ khuẩn lạc

Nếu có hai đĩa của mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm đặc) chứa ít hơn 15 khuẩn lạc, thì tính trung bình số học y của các khuẩn lạc đếm được trên cả hai đĩa.

Biểu thị kết quả như sau:

Đối với sản phẩm dạng lỏng : Số lượng nấm men và nấm mốc có trong một mililit được ước tính là: $N_E = y$

Đối với sản phẩm dạng khác: Số lượng nấm men và nấm mốc có trong 1 gam sản phẩm được ước tính là $N_E = y/d$

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

10.3. Không có các khuẩn lạc trên các đĩa

Nếu không có các khuẩn lạc trên các đĩa mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) thì số lượng nấm men và nấm mốc trong một mililit sản phẩm được ghi là nhỏ hơn 1.

Nếu không có các khuẩn lạc trên các đĩa của huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) thì số lượng nấm men và nấm mốc trong một gam sản phẩm được ghi là nhỏ hơn 10.

11. Độ chụm

Tính riêng về mặt thống kê, trong 95% trường hợp các giới hạn tin cậy của kỹ thuật lạc đếm khuẩn dao động từ $\pm 16\%$ đến $\pm 52\%$ (xem tài liệu tham khảo [3]); đối với các số đếm ít hơn 15 khuẩn lạc trong một đĩa, các giới hạn tin cậy được đưa ra trong phụ lục A. Trên thực tế, có thể gặp phải dao động thậm chí còn lớn hơn, đặc biệt là giữa các kết quả nhận được từ các nhân viên thử nghiệm khác nhau.

12. Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ

- Phương pháp lấy mẫu đã dùng, nếu biết;
- Phương pháp đã sử dụng, kể cả số ngày ủ;
- Kết quả thử nghiệm thu được; và
- Nêu kết quả cuối cùng thu được, nếu kiểm tra độ lặp lại.

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ ra phương pháp đã sử dụng và kết quả thu được. Cũng phải đề cập đến tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả

Báo cáo thử nghiệm cũng phải gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.

PHỤ LỤC A

(Quy định)

CÁC GIỚI HẠN TIN CẬY ĐỐI VỚI ƯỚC TÍNH SỐ LƯỢNG NHỎ KHUẨN LẠC

Các giới hạn tin cậy ở mức 95% về ước tính các số lượng nhỏ, khi số khuẩn lạc nhỏ hơn 15:

Số lượng khuẩn lạc ¹⁾	Số lượng vi sinh vật	Giới hạn tin cậy ở mức 95%		Phần trăm lỗi đối với giới hạn	
		Dưới	Trên	Dưới	Trên
1	1	<1	3	-97	+457
2	1	<1	4	-88	+261
3	2	<1	4	-79	+192
4	2	1	5	-73	+156
5	2	1	6	-68	+133
6	3	1	6	-63	+118
7	4	2	7	-60	+106
8	4	2	8	-57	+97
9	4	2	9	-54	+90
10	5	2	9	-52	+84
11	6	3	10	-50	+79
12	6	3	10	-48	+75
13	6	3	11	-47	+71
14	7	4	12	-45	+68
15	8	4	12	-44	+65
16	8	5	13	-43	+62
17	8	5	14	-42	+60
18	9	5	14	-41	+58
19	10	6	15	-40	+56
20	10	6	15	-39	+54
21	10	6	16	-38	+53
22	11	7	17	-37	+51
23	12	7	17	-36	+50
24	12	8	18	-36	+49
25	12	8	18	-35	+48
26	13	8	19	-35	+47
27	14	9	20	-34	+46
28	14	9	20	-34	+45
29	14	9	21	-33	+44
30	15	10	21	-32	+43

¹⁾ Đếm được trên hai đĩa Petri

²⁾ Được so sánh với số đếm vi sinh vật (cột 2)

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT

Định lượng *Pseudomonas* spp

Meat and meat products - Enumeration of Pseudomonas spp

TCVN 7138: 2002 hoàn toàn tương đương với ISO 13720: 1995;

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này mô tả phương pháp định lượng *Pseudomonas* spp, có trong thịt và sản phẩm thịt, kể cả thịt gia cầm.

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218) Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc - Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887:1983) Vi sinh vật học - Hướng dẫn chung về chuẩn bị các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 4833 - 2 : 2002 (ISO 3100 - 2 : 1988) Thịt và sản phẩm thịt - Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử - Phần 2 : Chuẩn bị mẫu thử để kiểm tra vi sinh vật.

3. Định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa sau:

3.1. ***Pseudomonas*** : Vi khuẩn thuộc loại *Pseudomonas* ở 25°C tạo thành các khuẩn lạc trong thạch xetrimít, fuxidin và xephacloridin (CFC) khi phép thử được tiến hành theo tiêu chuẩn này.

4. Nguyên tắc

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

Dưới các điều kiện tương tự, 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 48 h ở nhiệt độ 25°C trong điều kiện ưa khí.

4.3. Tính lượng *Pseudomonas* trong một mililit, hoặc trong một gam mẫu từ số khuẩn lạc điển hình và/ hoặc không điển hình thu được trên các đĩa ở các mức pha loãng được chọn sao để cho kết quả có ý nghĩa và được thử khẳng định bằng phép thử oxidaza và cho phát triển trên thạch Kligler

5. Dịch pha loãng, môi trường nuôi cấy và thuốc thử

5.1. Khái quát

Về thực hành phòng thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218).

5.2. Dịch pha loãng

Xem TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887).

5.3. Thạch xetrimit, fuxidin và xephacloridin (CFC)¹⁾

5.3.1. Môi trường cơ sở

5.3.1.1. Thành phần

Gelatin pepton	16,0g
Casein hydrolysate	10,0g
Kali sunfat(K ₂ SO ₄)	10,0g
Magie clorua (MgCl ₂)	1,4g
Thạch	12,0 đến 18,0g ¹⁾
Nước	1000ml
¹⁾ Tùy 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 ± 0,2 ở 25°C, nếu cần.

Phân chia môi trường thành các lượng 100 ml vào các bình hoặc các chai có dung tích thích hợp.

Khử trùng môi trường trong nồi hấp áp lực (6.1) 15 phút để ở 121°C.

5.3.2. Các dung dịch ức chế

Không giữ các dung dịch quá 7 ngày trong tủ lạnh.

5.3.2.1. Dung dịch Xetrimit: Dung dịch A

5.3.2.1.1. Thành phần

Xetrimit ¹⁾	0,1g
Nước	100ml
¹⁾ Hỗn hợp gồm chủ yếu là tetradexyltrimetylamoni bromua với các lượng nhỏ hơn của dodexyltrimetylamoni bromua và xetrimoni bromua.	

5.3.2.1.2. Chuẩn bị

Hoà tan xetrimit trong nước.

Lọc để khử trùng.

5.3.2.2. Dung dịch fuxidin: Dung dịch B

5.3.2.2.1. Thành phần

Fuxidin (C ₃₁ H ₄₇ NaO ₆)	0,1g
Nước	100ml

5.3.2.2. Chuẩn bị

Hoà tan fuxidin trong nước.

Lọc để khử trùng.

5.3.2.3. Dung dịch xephacloridin: Dung dịch C

5.3.2.3.1. Thành phần

Xephacloridin ($C_{19}H_{17}N_3O_4S_2$)	0,1g
Nước	100ml

5.3.2.3.2. Chuẩn bị

Hoà tan xephacloridin trong nước

Lọc để khử trùng.

5.3.3. Môi trường hoàn chỉnh

5.3.3.1. Thành phần

Môi trường cơ sở	100ml
Dung dịch A	1 ml
Dung dịch B	1 ml
Dung dịch C	5 ml

5.3.3.2. Chuẩn bị

Dưới các điều kiện vô trùng, bổ sung các dung dịch chất ức chế vào môi trường cơ sở, làm tan chảy, duy trì ở 47°C và trộn cẩn thận.

5.3.4. Chuẩn bị các đĩa thạch CFC

Rót khoảng 15 ml môi trường hoàn chỉnh vào các đĩa Petri vô trùng (6.9). Để yên cho đặc lại.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô các đĩa thạch, tốt nhất là mở nắp ra và lật ngược đĩa thạch xuống dưới, đặt vào tủ sấy (6.2) để ở nhiệt độ từ 35°C đến 55°C, cho đến khi các giọt nước đã biến khỏi mặt của môi trường. Tiếp theo không làm khô thêm nữa. Các đĩa thạch cũng có thể được làm khô trong tủ sấy vô trùng an toàn khoảng 30 phút khi đĩa được mở một nửa nắp hoặc đĩa đậy nắp thì để qua đêm.

Nếu đĩa đã được chuẩn bị trước thì các đĩa thạch chưa được làm khô không được để lâu quá 1 tháng ở nhiệt độ từ 0°C đến 5°C.

5.4. Thạch dinh dưỡng

5.4.1. Thành phần

Cao thịt	3,0 g
Pepton	5,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0g
Thạch	từ 12,0 đến 18,0 g ¹⁾
Nước	1000 ml

¹⁾ Tuỳ vào sức đông của thạch

5.4.2. Chuẩn bị

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

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

Chia môi trường thành các lượng 100 ml vào các bình hoặc các chai dung tích không lớn hơn 500 ml.

Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.1) 20 phút để ở 121°C .

5.4.3. Chuẩn bị các đĩa thạch dinh dưỡng

Chuyển các phần mỗi phần khoảng 15 ml môi trường nuôi cấy mới chuẩn bị sang các đĩa Petri đường kính 90 mm (6.9) và để cho đông đặc lại.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô các đĩa thạch như mô tả trong 5.3.4.

Nếu đã được chuẩn bị trước, thì các đĩa thạch chưa được làm khô không được để lâu quá 1 tháng ở nhiệt độ từ 0°C đến 5°C .

5.5. Thạch Kligler

5.5.1. Thành phần

Cao thịt bò	3,0 g
Cao men	3,0 g
Pancreatic casein pepton	20,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Lactoza	10,0 g
Glocoza	1,0 g
Sắt (II) amoni sunfat ngậm 6 phân tử nước $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$	0,5 g
Natri thiosunfat ngậm 5 phân tử nước $(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$	0,5 g
Đỏ phenol	0,025 g
Thạch	từ 12,0 g đến 18,0 g ¹⁾
Nước	1000ml

¹⁾ Tùy thuộc vào sức đông của thạch

5.5.2. Chuẩn bị

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

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

Phân chia môi trường thành các lượng 10 ml vào các ống thử nghiệm (6.7).

Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.1) 15 phút để ở 121°C .

Để yên ở trạng thái nghiêng sao cho đoạn đầu mút ngập sâu được 2,5 cm.

Chú ý - Không chuẩn bị môi trường này quá 7 ngày hoặc 8 ngày trước khi sử dụng. Mặt khác, môi trường này phải được làm tan chảy và phải được phục hoạt trong nồi cách thủy đun sôi, sau đó để đông đặc lại trạng thái đúng của nó.

5.6. Thuốc thử để phát hiện oxidaza

5.6.1. Thành phần

N,N,N',N'-tetrametyl- <i>p</i> -phenylenediamin dihydroclorua	1,0 g
Nước	100 ml

5.6.2. Chuẩn bị

Hoà tan thuốc thử trong nước ngay trước khi sử dụng.

6. Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Xem TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218).

Tất cả các dụng cụ thủy tinh phải bền với việc khử trùng nhiều lần. Xem TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887).

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm vi sinh thông thường và đặc biệt là:

6.1. Thiết bị khử trùng khô (tủ sấy) hoặc thiết bị khử trùng ướt (nồi hấp áp lực).

Xem TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218).

6.2. Tủ sấy hoặc tủ thông gió (để làm khô các đĩa thạch), có thể duy trì được nhiệt độ từ $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ đến $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, hoặc tủ cấy vô trùng.

6.3. Tủ ẩm, có khả năng duy trì nhiệt độ ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.4. Nồi cách thủy, có khả năng duy trì ở $47^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

6.5. pH-met, có độ chính xác đến ± 1 đơn vị pH ở 25°C .

6.6. Que cấy vòng, bằng platin/iridi, niken/crom hoặc bằng chất dẻo vô trùng, đường kính khoảng 3 mm và dây cùng chất liệu hoặc đĩa thủy tinh.

Chú thích 1 - Không sử dụng que cấy vòng bằng niken/crom trong phép thử oxidaza (xem 9.4.2.1).

6.7. Ống và chai thử nghiệm, có dung tích thích hợp.

6.8. Pipet chia độ xả hết, được hiệu chuẩn chỉ dùng cho kiểm tra vi khuẩn, dung tích danh định 1 ml được chia vạch 0,1 ml và có lỗ xả đường kính từ 2 mm đến 3 mm.

6.9. Đĩa Petri, làm bằng thủy tinh hoặc chất dẻo, đường kính từ 90 mm đến 100mm.

6.10. Que gạt, bằng thủy tinh hoặc bằng chất dẻo, thí dụ cán cầm bằng đĩa thủy tinh dài 20cm và có đường kính khoảng 3,5mm, một đầu dài khoảng 3cm được uốn vuông góc và đầu mút được làm nhẵn bằng nhiệt.

7. Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 4833 - 1 : 2002 (ISO 3100 - 1).

Bảo quản mẫu để tránh bị hư hỏng và thay đổi thành phần, nếu cần.

8. Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 4833 - 2 : 2002 (ISO 3100 - 2).

9. Cách tiến hành

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

Xem TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887).

9.2. *Cấy và ủ*

9.2.1. Lấy hai đĩa thạch CFC (5.3.4). Dùng pipet vô trùng (6.8) chuyển vào mỗi đĩa 0,1 ml huyền phù ban đầu.

Lấy hai đĩa CFC khác. Dùng pipet vô trùng (6.8) chuyển vào mỗi đĩa 0,1 ml dung dịch pha loãng thập phân thứ nhất của huyền phù ban đầu (10^{-2}).

Lặp lại các thao tác trên đối với từng độ pha loãng tiếp theo, dùng pipet vô trùng mới cho mỗi độ pha loãng.

9.2.2. Dùng que gạt mẫu vô trùng (6.10) để dàn đều chất lỏng trên bề mặt đĩa thạch cho đến khô.

9.2.3. Lật ngược các đĩa đã chuẩn bị và làm mát đến 25°C rồi ủ trong tủ ẩm (6.3) 48 h ở nhiệt độ 25°C.

9.3. *Đếm và chọn các khuẩn lạc*

Sau khi kết thúc thời gian ủ qui định, đếm số khuẩn lạc trên từng đĩa và giữ lại các đĩa chứa từ 15 khuẩn lạc đến 300 khuẩn lạc.

Từ mỗi đĩa được giữ lại chọn năm khuẩn lạc một cách ngẫu nhiên.

9.4. *Thử khẳng định*

9.4.1. *Cấy truyền*

Ria cấy từ mỗi khuẩn lạc đã chọn lên các đĩa thạch dinh dưỡng (5.4.3) để thử khẳng định.

Ủ các đĩa này 24 h ở nhiệt độ 25°C. Trên mỗi đĩa chọn lấy một khuẩn lạc phân lập tốt để thử khẳng định đặc tính sinh hoá (xem 9.4.2).

9.4.2. *Thử khẳng định đặc tính sinh hoá*

9.4.2.1. *Phản ứng oxidaza*

9.4.2.1.1. *Thành phần*

N,N,N',N'-Tetrametyl-p-phenylenediamin dihydroclorua	1,0 g
Nước	100 ml

9.4.2.1.2. *Chuẩn bị*

Hoà tan thuốc thử trong nước. Thuốc thử phải được chuẩn bị ngay trước khi sử dụng.

Có thể sử dụng các đĩa hoặc que cấy bán sẵn. Khi đó, theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

9.4.2.1.3. *Cách tiến hành*

Làm ẩm mảnh giấy lọc bằng thuốc thử. Dùng dây platin hoặc bằng đũa thuỷ tinh hoặc đũa bằng chất dẻo (dây bằng niken/crom cho kết quả dương sai) để lấy mẫu vi khuẩn thu được trên môi trường thạch cho lên giấy lọc đã được làm ẩm.

9.4.2.1.4. *Giải thích kết quả*

Trong trường hợp có mặt oxidaza, thì có màu tím đến màu đỏ tía trong khoảng từ 5 s đến 10 s. Nếu sau 10 s mà màu sắc không đổi thì phép thử được coi là âm tính.

9.4.2.2. *Đặc tính chuyển hoá đường trong thạch Kligler*

Cấy ria xiên lên bề mặt thạch (5.5.2) bằng các khuẩn lạc tương tự trong 9.4.2 và đâm xuyên xuống đáy của ống thạch. Ủ 24 h ở 25°C.

9.4.2.3. *Giải thích kết quả*

Các khuẩn lạc cho thấy phản ứng oxidaza dương tính và khi cấy vào trong thạch Kligler chỉ thấy phát triển trên bề mặt (ưa khí) được coi là các khuẩn lạc *Pseudomonas*.

10. Biểu thị kết quả**10.1. Phương pháp tính**

Sau khi nhận dạng, tính số lượng vi sinh vật, a , đã được thử khẳng định trên mỗi đĩa, dùng công thức sau:

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

Trong đó

A là số lượng khuẩn lạc được chọn để thử khẳng định (trong trường hợp này là 5);

b là số khuẩn lạc phù hợp với chuẩn mực nhận dạng;

C là tổng số khuẩn lạc đếm được.

Tính số lượng vi sinh vật đã nhận dạng, N , trong mẫu thử là trung bình của hai độ pha loãng liên tiếp, theo công thức sau:

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

Trong đó:

$\sum a$ là tổng các khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại sau khi nhận dạng;

V là thể tích mẫu cấy đã sử dụng trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;

n_1 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng đầu tiên;

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

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

Làm tròn các kết quả tính được đến hai chữ số có nghĩa. Như vậy, nếu chữ số sau cùng nhỏ hơn 5 thì số đứng trước số đó không bị thay đổi, còn nếu chữ số sau cùng là 5 hoặc lớn hơn 5 thì tăng số đứng trước lên một đơn vị. Làm tròn tiếp theo cho đến khi thu được hai chữ số có nghĩa.

Lấy kết quả là số lượng vi sinh vật trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong một gam (sản phẩm dạng khác), được biểu thị bằng số từ 1,0 đến 9,9 nhân với lũy thừa tương ứng của 10.

10.2. Các số đếm ước tính

10.2.1. Nếu có hai đĩa mẫu thử gốc (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm ở dạng khác) chứa ít hơn 15 khuẩn lạc, thì tính trung bình số học y của các khuẩn lạc đếm được trên cả hai đĩa.

Biểu thị kết quả như sau:

- Đối với sản phẩm dạng lỏng: Số lượng vi sinh vật ước tính trong một mililit là: $N_E = y$
- Đối với sản phẩm dạng khác: Số lượng vi sinh vật ước tính trong một gam sản phẩm là: $N_E = y/d$

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

10.2.2. Nếu trên hai đĩa mẫu thử gốc (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) không có bất kỳ một khuẩn lạc nào thì biểu thị kết quả như sau:

- Ít hơn 1 vi sinh vật trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng);

- Ít hơn 1/*d* vi sinh vật trong một gam (sản phẩm dạng khác).
Trong đó *d* là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu.

10.3. Giới hạn tin cậy

Xem TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218).

11. Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ:

- Phương pháp lấy mẫu;
- Phương pháp đã sử dụng;
- Số ngày ủ;
- Kết quả thử nghiệm thu được;
- Kết quả cuối cùng thu được, nếu kiểm tra độ lặp lại.

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ ra phương pháp đã sử dụng và kết quả thu được. Cũng phải đề cập đến tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả.

Báo cáo thử nghiệm cũng phải gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.

PHỤ LỤC A

(tham khảo)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] MEAD, G.C and ADAMS, B.W.A selective medium for the rapid isolation of *Pseudomonas* associated with poultry meat spoilage. Br. Poult. Sci, 18, 1977, pp. 661 - 670.
- [2] TCVN 4833 - 1 : 2002 (ISO 3100 - 1 : 1991) Thịt và sản phẩm thịt - Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử - Phần 1 : Lấy mẫu.

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT
Định lượng *Brochothrix thermosphacta*
Kỹ thuật đếm khuẩn lạc
*Meat and meat products - Enumeration of *Brochothrix thermosphacta* - Colony-count technique*

TCVN 7139: 2002 hoàn toàn tương đương với ISO 13722: 1996;

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng *Brochothrix thermosphacta* có trong tất cả các loại thịt và sản phẩm thịt kể cả thịt gia cầm, bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc.

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218) vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc - Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887 : 1983) Vi sinh vật học - Hướng dẫn chung về chuẩn bị các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 4833 - 2 : 2002 (ISO 3100 - 2 : 1988) Thịt và sản phẩm thịt - Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử - Phần 2 : Chuẩn bị mẫu thử để kiểm tra vi sinh vật.

3. Định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa sau:

3.1. *Brochothrix thermosphacta*: Vi khuẩn gram dương tạo thành các khuẩn lạc oxidaza âm tính đặc trưng trên môi trường đặc chọn lọc [thạch streptomycin sunfat/tali axetat/ actidion (STAA)] trong các điều kiện thử qui định của tiêu chuẩn này.

4. Nguyên tắc

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

Dưới các điều kiện tương tự, chuẩn bị các đĩa khác sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu.

4.2. *Ủ các đĩa ở nhiệt độ từ 22°C đến 25°C trong khoảng 48 h ± 4 h.*

4.3. *Lấy các khuẩn lạc để thử khẳng định.*

4.4. *Từ số khuẩn lạc đã được thử khẳng định*, tính lượng *Brochothrix thermosphacta* có trong một mililit, hoặc trong một gam mẫu từ số khuẩn lạc thu được trên các đĩa ở các mức pha loãng được chọn sao cho kết quả tin cậy nhất (xem 9.3).

5. Dịch pha loãng, môi trường nuôi cấy và thuốc thử

5.1. Khái quát

Về thực hành phòng thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404: 1998 (ISO 7218).

5.2. Dịch pha loãng

Xem TCVN 6507: 1999 (ISO 6887).

5.3. Môi trường đặc chọn lọc: Thạch streptomixin sunfat/tali axetat/actidion (STAA) (xem tài liệu tham khảo [2])

5.3.1. Môi trường cơ sở

5.3.1.1. Thành phần

Pepton	20,0 g
Cao men	2,0 g
Glyxerol	15,0g
Dikali hidro phosphat (K_2HPO_4)	1,0 g
Magie sunfat ngậm 7 phân tử nước ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1,0g
Thạch	9g đến 18 g ¹⁾
Nước	900 ml
¹⁾ Tùy 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. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là 7,0 ở 25°C

Khử trùng môi trường trong nồi hấp áp lực (6.1) 15 phút để ở 121°C.

5.3.2. Dung dịch streptomixin sunfat

5.3.2.1. Thành phần

Streptomixin sunfat	1,0 g
Nước	100 ml

5.3.2.2. Chuẩn bị

Hoà tan streptomixin sunfat trong nước. Lọc để khử trùng.

5.3.3. Dung dịch actidion

Cảnh báo - Actidion và tali axetat là các chất độc. Khi làm việc với các hoá chất và các dung dịch của chúng phải thực hiện các qui trình thích hợp để tránh bị nhiễm sang người thực hiện và môi trường.

5.3.3.1. Thành phần

Actidion (xycloheximit)	150 g
Nước	90 ml

5.3.3.2. Chuẩn bị

Hoà tan actidion trong nước. Lọc để khử trùng.

5.3.4. Dung dịch tali axetat

5.3.4.1. Thành phần

Tali axetat	250 g
Nước	100 ml

5.3.4.2. Chuẩn bị

Hòa tan trong nước. Lọc để khử trùng.

5.3.5. Môi trường hoàn chỉnh

5.3.5.1. Thành phần

Môi trường cơ sở (5.3.1)	900 ml
Dung dịch streptomixin sunfat (5.3.2)	50 ml
Dung dịch actidion (5.3.3)	30 ml
Dung dịch tali axetat (5.3.4)	20 ml

5.3.5.2. Chuẩn bị

Làm tan chảy môi trường cơ sở và làm nguội trên nồi cách thủy (6.9) ở nhiệt độ 47°C. Dưới các điều kiện vô trùng, làm ấm các phần dung dịch khác (5.3.2, 5.3.3 và 5.3.4) đến 47°C trong nồi cách thủy. Cho các lượng thể tích qui định (5.3.5.1) của các dung dịch vào môi trường cơ sở đã nguội, lắc đều giữa các lần thêm

5.3.6. Chuẩn bị các đĩa thạch để đếm

Rót từ 15 ml đến 20 ml môi trường hoàn chỉnh (5.3.5) vào các đĩa Petri vô trùng (6.4). Để yên cho đặc lại.

Các đĩa này có thể được bảo quản trước khi được làm khô 1 tuần ở nhiệt độ từ 0°C đến 5°C.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô các đĩa thạch, tốt nhất là mở nắp ra và lật ngược đĩa thạch xuống dưới, đặt vào tủ (6.2) để ở nhiệt độ từ 37°C đến 50°C, cho đến khi các giọt nước đã biến khỏi mặt của môi trường. Sau đó không làm khô thêm nữa. Các đĩa thạch cũng có thể được làm khô trong tủ sấy 30 phút với đĩa được mở một nửa nắp hoặc để qua đêm với nắp đĩa vẫn đóng nguyên.

Các đĩa thạch đã được chuẩn bị có bán sẵn. Bảo quản và sử dụng các đĩa này theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

5.4. Thuốc thử oxidaza

5.4.1. Thành phần

N,N,N',N'-Tetrametyl-p-phenylenediamin dihydroclorua	1,0 g
Nước cất	100 ml

5.4.2. Chuẩn bị

Hòa tan thuốc thử trong nước lạnh. Thuốc thử phải được chuẩn bị ngay trước khi sử dụng.

Có thể sử dụng các đĩa hoặc các que cấy bán sẵn. Khi đó sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất

6. Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm vi sinh thông thường và đặc biệt là các dụng cụ sau:

6.1. *Thiết bị khử trùng khô (tủ sấy) hoặc thiết bị khử trùng ướt (nồi hấp áp lực).*

Xem TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218).

6.2. *Tủ ấm hoặc tủ sấy*, thông gió đối lưu, có thể duy trì được nhiệt độ từ $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ đến $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.3. *Tủ ấm*, có khả năng hoạt động ở nhiệt độ từ $22^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$ đến $25^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$.

6.4. *Đĩa Petri*, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo, đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

6.5. *Pipet chia độ xả hết (blow-out)*, có miệng xả rộng, dung tích danh định 10 ml và 1 ml, được chia vạch 0,1 ml.

6.6. *Bầu cao su*, hoặc loại thiết bị khác thích hợp để sử dụng với pipet chia độ.

6.7. *Chai hoặc bình cấy có dung tích thích hợp.*

6.8. *Que gạt*, bằng thủy tinh, dài 20 cm và có đường kính khoảng 3,5 mm và chiều dài 20 cm, một đầu được uốn cong tạo các gấp dài khoảng 3 cm và đầu mút được làm nhẵn bằng nhiệt.

Các que gạt mẫu bằng nhựa vô trùng sử dụng một lần cũng có thể được sử dụng.

6.9. *Nồi cách thủy*, có khả năng duy trì ở $47^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

6.10. *Thiết bị đếm khuẩn lạc*, có nền đen được chiếu sáng và có máy đếm điện tử số hoặc cơ học.

6.11. *pH-met*, có độ chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị pH ở 25°C .

6.12. *Que cấy vòng*, bằng platin, hoặc đĩa thủy tinh hoặc chất dẻo đường kính khoảng 3 mm.

7. Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo qui định trong TCVN 4833 - 1: 2002 (ISO 3100-1).

8. Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử đại diện theo TCVN 4833 - 2 : 2002 (ISO 3100 - 2). Kiểm tra mẫu đã được xử lý trước càng sớm càng tốt. Nếu cần, có thể bảo quản mẫu ở nhiệt độ từ 0°C đến $+ 2^{\circ}\text{C}$, nhưng không quá 24 h.

9. Cách tiến hành

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

Xem TCVN 4833 - 2 : 2002 (ISO 3100 - 2) và TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887 : 1983).

9.2. *Cấy và ủ*

9.2.1. Dùng pipet vô trùng (6.5) chuyển sang hai đĩa thạch (5.3.6), mỗi đĩa 0,1 ml mẫu thử nếu sản phẩm dạng lỏng hoặc huyền phù ban đầu nếu sản phẩm ở dạng khác. Lặp lại qui trình này với các độ pha loãng thập phân tiếp theo.

9.2.2. Dùng que gạt mẫu (6.8) để dàn đều chất lỏng trên bề mặt đĩa thạch càng nhanh càng tốt mà không chạm que gạt mẫu vào cạnh của đĩa. Đối với mỗi đĩa sử dụng một que gạt mẫu mới. Để các đĩa được đậy nắp trong khoảng 15 min ở nhiệt độ môi trường bình thường để chất lỏng hút bám vào thạch.

9.2.3. Lật ngược các đĩa đã chuẩn bị (9.2.2) và ủ trong tủ ấm (6.3) trong vòng $48 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$ ở nhiệt độ từ 22°C đến 25°C .

9.3. Đếm khuẩn lạc

Sau khi kết thúc thời gian ủ qui định (9.2.3), đếm các khuẩn lạc đặc trưng trên các đĩa và giữ lại các đĩa chứa từ 15 khuẩn lạc đến 300 khuẩn lạc, bằng dụng cụ đếm khuẩn lạc (6.10). Các khuẩn lạc đặc trưng bóng, tròn hoặc các khuẩn lạc mọc vòng tròn có đường kính 0,75 mm hoặc lớn hơn, có màu trắng nhạt và chúng âm tính oxidaza (9.4).

9.4. Thử kháng định

Pseudomonas có thể mọc trên thạch STAA (5.3). Chúng khác với *B. Thermosphacta* bởi phép thử oxidaza như sau:

Làm ẩm mảnh giấy lọc bằng thuốc thử oxidaza (5.4). Dùng que cấy vòng platin hoặc đũa thủy tinh hoặc đũa bằng chất dẻo (6.12) (que cấy vòng bằng niken/crom cho kết quả dương sai) lấy mẫu các chất cấy vi khuẩn thu được từ đĩa thạch TSAA và đặt lên giấy lọc đã được làm ẩm. Các khuẩn lạc oxidaza dương tính xuất hiện màu đỏ tía trong vòng 15 s. *Brochothrix thermophacta* là các khuẩn lạc oxidaza âm tính.

10. Biểu thị kết quả

10.1. Số đếm *brochothrix thermophacta*

10.1.1. Nếu ít nhất là 80% các khuẩn lạc được chọn đã được thử kháng định (9.4), thì số lượng *Brochothrix thermophacta* là số đếm được trong 9.3.

10.1.2. Trong các trường hợp khác, tính số lượng *Brochothrix thermophacta* từ phần trăm *Brochothrix thermophacta* thu được trong 9.3 đã được thử kháng định (9.4).

Lấy kết quả đến tròn số.

10.2. Phương pháp tính

10.2.1. Trường hợp chung: Các đĩa chứa từ 15 khuẩn lạc đến 300 khuẩn lạc đặc trưng

Giữ lại các đĩa chứa không quá 300 khuẩn lạc đặc trưng ở hai độ pha loãng liên tiếp. Cần sử dụng một trong các đĩa này chứa ít hơn 15 khuẩn lạc đặc trưng

Tính số lượng *Brochothrix thermophacta* trong một gam hoặc một mililit sản phẩm, N, tùy từng trường hợp, theo công thức sau:

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

Trong đó:

$\sum a$ là tổng các khuẩn lạc đặc trưng đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại ở hai độ pha loãng liên tiếp, có ít nhất một đĩa chứa 15 khuẩn lạc;

V là thể tích mẫu cấy được sử dụng trên mỗi đĩa;

n_1 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng đầu tiên;

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

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất.

Làm tròn các kết quả tính được đến hai chữ số có nghĩa. Như vậy, nếu chữ số sau cùng nhỏ hơn 5 thì số đứng trước số đó không bị thay đổi, còn nếu chữ số sau cùng là 5 hoặc lớn hơn 5 thì tăng số đứng trước lên một đơn vị. Làm tròn tiếp theo cho đến khi thu được hai chữ số có nghĩa.

Lấy kết quả là số lượng *Brochothrix thermophacta* trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong một gam (sản phẩm dạng khác), được biểu thị bằng số từ 1,0 đến 9,9 nhân với lũy thừa tương ứng của 10.

Thí dụ:

Số đếm *Brochothrix thermophacta* ở nhiệt độ từ 22°C đến 25°C cho các kết quả sau:

- Ở độ pha loãng thứ nhất giữ lại: 83 khuẩn lạc và 97 khuẩn lạc đặc trưng;
- Ở độ pha loãng thứ hai giữ lại: 13 khuẩn lạc và 8 khuẩn lạc đặc trưng.

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1 n_2)d} = \frac{83 + 97 + 13 + 8}{0,1[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-1}} = \frac{201}{0,022} = 9136$$

Làm tròn kết quả như qui định trên ta có 9100 hoặc $9,1 \times 10^3$ *Brochothrix thermophacta* trong một mililit hoặc một gam sản phẩm.

10.2.2. Ước tính các số lượng nhỏ khuẩn lạc

Nếu có hai đĩa của mẫu thử gốc (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm ở dạng khác) chứa từ 0 đến 15 khuẩn lạc, thì báo cáo kết quả như sau:

Biểu thị kết quả như sau:

- Ít hơn 15 *Brochothrix thermophacta* trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng), hoặc
- Ít hơn 151/d *Brochothrix thermophacta* trong một gam (sản phẩm dạng khác).

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

Nếu trên hai đĩa mẫu thử gốc (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) không có bất kỳ một khuẩn lạc đặc trưng nào thì biểu thị kết quả như sau:

- Ít hơn 1 *Brochothrix thermophacta* trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng);
- Ít hơn 1/d *Brochothrix thermophacta* trong một gam (sản phẩm dạng khác).

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

11. Độ chụm

Khoảng tin cậy của phương pháp này dao động từ -7% đến 8% đối với 300 khuẩn lạc và từ -29% đến 41% đối với 15 khuẩn lạc.

12. Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ phương pháp đã sử dụng và kết quả thử nghiệm thu được.

Cũng phải đề cập đến tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả.

Báo cáo thử nghiệm cũng phải gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT

Phát hiện phẩm màu

Phương pháp sử dụng sắc ký lớp mỏng

*Meat and meat products - Detection of colouring agents -
Method using thin-layer chromatography*

TCVN 7140: 2002 hoàn toàn tương đương với ISO 13496: 2000;

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp sắc ký lớp mỏng để phát hiện các phẩm màu tổng hợp tan trong nước có trong thịt và sản phẩm thịt.

Phương pháp này có thể phát hiện các phẩm màu sau đây:

Tartrazin	Patent Blue V
Quinolin Yellow	Indigotin
Sunset Yellow FCF	Brilliant Black PN
Amaranth	Black 7984
Ponceau 4R	Fast Green FCF
Erythrosin	Blue VRS

Các từ đồng nghĩa và các số nhận biết của các phẩm màu này được liệt kê trong phụ lục A.

Các phẩm màu thực vật và các chiết xuất từ thực vật được quan sát cho thấy không cản trở đến phương pháp này được liệt kê trong bảng B.1. Các phẩm màu tự nhiên trong một số trường hợp cho thấy gây cản trở đến phương pháp này được liệt kê trong bảng B.2.

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 4851 - 89 (ISO 3639 : 1987) Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm - Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử

AOAC 46.1.08 : 1995 Official Methods of Analysis (Các phương pháp phân tích chính thức (AOAC quốc tế)

3. Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa sau

3.1. Phát hiện các phẩm màu (*Detection of colouring agents*): Việc phát hiện sự có mặt hay không có mặt các phẩm màu theo phương pháp được qui định trong tiêu chuẩn này.

4. Nguyên tắc

Chiết các phẩm màu ra khỏi phần mẫu thử bằng nước nóng và hấp phụ vào bột polyamit. Làm

sạch các phẩm màu đã chiết bằng sắc ký cột và rửa giải các chất màu ra khỏi cột. Nhận biết các phẩm màu bằng sắc ký lớp mỏng.

5. Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích, trừ khi có qui định khác.

5.1. *Nước*, đạt ít nhất là nước loại 3 của TCVN 4851 - 89 (ISO 3639).

5.2. *Ete dầu hoả*, có dải nhiệt độ sôi từ 40°C đến 60°C.

5.3. *Metanol*.

5.4. *Amoniac*, dung dịch 25%, $\rho_{20} = 0,910$ g/ml.

5.5. *Axit axetic*, 100% phân khối lượng, $\rho_{20} = 1,050$ g/ml

5.6. *Trinatri xitrat ngậm 2 phân tử nước*.

5.7. *Propan-1-ol*.

5.8. *Etyl axetat*.

5.9. *2 - metyl-2-propanol*.

5.10. *Axit propionic*.

5.11. *Dung dịch rửa giải dùng cho sắc ký cột*.

Trộn 95 thể tích metanol (5.3) với 5 thể tích dung dịch amoniac (5.4).

5.12. *Axit axetic*, dung dịch 50% trong metanol.

Trộn 1 thể tích axit axetic (5.5) với 1 thể tích metanol (5.3).

5.13. *Bột polyamit*, có cỡ hạt từ 0,05 mm đến 0,16 mm. .

5.14. *Cát, hạt mịn*, được rửa bằng axit clohidric, trung hoà và được nung khô.

5.15. *Chất màu đối chứng tiêu chuẩn*

Độ tinh khiết của các chất màu tiêu chuẩn có thể thay đổi, vì vậy cần phải biết được độ tinh khiết của các chất màu được sử dụng làm chất chuẩn. Độ tinh khiết được xác định bằng phương pháp AOAC 46.1.08.

Chú thích - Có thể sử dụng các chất màu thực phẩm đã được chứng nhận làm các chất chuẩn

5.16. *Dung dịch đối chứng tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lớp mỏng*

Tạo riêng rẽ các dung dịch trong nước của từng chất màu đối chứng tiêu chuẩn (5.15) có hàm lượng chất màu tiêu chuẩn khoảng 1 g/l.

Chuẩn bị các dung dịch indigotin trong ngày sử dụng. Các dung dịch khác giữ được ít nhất 3 tháng (các dung dịch của erytroxin thì 1 tháng) khi bảo quản nơi tối.

5.17. *Chất rửa giải dùng cho sắc ký lớp mỏng: Dung dịch I*

Cân 25 g trinatri xitrat ngậm 2 phân tử nước (5.6), chính xác đến 0,1 g, cho vào bình định mức một vạch 1 000 ml. Hoà tan trong nước, pha loãng bằng nước đến vạch và lắc đều.

Trộn 80 thể tích dung dịch xitrat này với 20 thể tích dung dịch amoniac (5.4) và 12 thể tích metanol (5.3).

Để tránh nhiễu hoặc khử nhiễu do saflo hoặc safran, nên sử dụng dung dịch sắc ký II (5.18).

5.18. *Chất rửa giải dùng cho sắc ký lớp mỏng: Dung dịch II*

Trộn 6 thể tích propan-1-ol (5.7) với 1 thể tích etyl axetal (5.8) và 3 thể tích nước.

5.19. Chất rửa giải dùng cho sắc ký lớp mỏng : Dung dịch III

Trộn 50 thể tích 2-metyl-2-propanol (5.9) với 12 thể tích propionic (5.10) và 38 thể tích nước

6. Thiết bị và dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm thông thường và đặc biệt là các dụng cụ sau:

6.1. Thiết bị đồng hoá bằng cơ hoặc bằng điện, có thể đồng hoá mẫu phòng thử nghiệm.

Dùng máy cắt quay tốc độ cao hoặc máy xay gắn một tấm đục lỗ với đường kính lỗ không quá 4,0 mm.

6.2. Ống ly tâm, bằng thuỷ tinh, dung tích 75 ml.

6.3. Bình đáy phẳng, có nút thuỷ tinh mài, dung tích 250 ml.

6.4. Bình đáy tròn, có khớp nối bằng thuỷ tinh, dung tích 100 ml.

6.5. Máy ly tâm, hoạt động ở gia tốc quay khoảng 2 000 g.

6.6. Bộ cô quay chân không.

6.7. Cột sắc ký, bằng thuỷ tinh gắn bộ lọc và có vòi, dài khoảng 20 cm, đường kính khoảng 30 mm, cỡ 1 lỗ của bộ lọc từ 40 µm đến 100 µm (độ xốp P 100 theo ISO 4793 [2]).

Cho một vài sợi len thuỷ tinh vào cột và thêm khoảng 1 g đến 2 g cát (5.14).

6.8. Bình chứa bằng chất dẻo, dung tích khoảng 10 ml, có nắp đậy.

6.9. Tấm lớp mỏng, được phủ một lớp bột xenluloza dày 0,10 mm hoặc tương đương.

Sử dụng các tấm bán sẵn thích hợp.

6.10. Micropipet, dung tích khoảng 5 µl.

6.11. pH-met, có độ chính xác đến 0,1 đơn vị pH.

7. Lấy mẫu

Việc lấy không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo qui định trong TCVN 4833-1 : 2002 (ISO 3100-1) [1]

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

Tiến hành từ mẫu đại diện ít nhất là 200 g. Bảo quản mẫu sao để tránh giảm chất lượng và biến đổi thành phần.

8. Chuẩn bị mẫu thử

Đồng hoá mẫu phòng thử nghiệm bằng thiết bị thích hợp (6.1). Chú ý sao cho nhiệt độ vật liệu thử không tăng quá 25°C. Nếu sử dụng máy xay thì cho xay mẫu ít nhất hai lần.

Cho đầy mẫu đã chuẩn bị vào vật chứa kín khí. Đậy vật chứa lại và bảo quản sao cho tránh được sự giảm chất lượng và thay đổi thành phần của mẫu. Phân tích mẫu càng sớm càng tốt, nhưng phải trong 24 h sau khi mẫu đã đồng hoá.

9. Cách tiến hành

Cảnh báo - Nếu mẫu chứa indigonin, thì trong suốt quá trình phân tích nhiệt độ không được vượt quá 35 °C. Indigotin trong dung dịch sắc ký I bị phân huỷ từng phần, do đó nên sử dụng dung dịch sắc ký II.

Erytroxin rất nhạy với ánh sáng. Khi phải tạm dừng phân tích, các dung dịch và các tấm sắc ký phải được bảo quản nơi tối. Cũng tương tự đối với indigotin.

9.1. *Phân mẫu thử*

Cân 5 g mẫu thử đã chuẩn bị (xem điều 8), chính xác đến 0,1 g cho vào ống ly tâm (6.2).

Đối với các mẫu có chất béo thì tiến hành theo 9.2.

Đối với các mẫu không có chất béo thì tiến hành theo 9.3.

9.2. *Mẫu có chất béo*

Cho khoảng 20 ml ete dầu hoả (5.2) vào ống ly tâm và trộn đều bằng đũa thuỷ tinh. Gạn bỏ ete dầu hoả.

Lặp lại thao tác này ba lần.

9.3. *Mẫu không có chất béo*

Cho 25 ml nước sôi (xem cảnh báo ở trên) và trộn. Thêm 25 ml dung dịch chất rửa giải (5.11).

Kiểm tra pH là $9 \pm 0,5$ bằng pH-met (6.11). Nếu không, chỉnh pH bằng axit axetic (5.5) hoặc dung dịch amoniac (5.4).

Trộn đều. Làm lạnh mẫu 15 min trong tủ đông lạnh (để tránh đục).

Ly tâm (6.5) trong 10 min ở gia tốc quay khoảng 2 000 g_n

Gạn dung dịch trong cho vào bình đáy phẳng (6.3). Trong trường hợp đối với indigotin thì sử dụng bình đáy tròn (6.4).

Thêm 5 ml nước vào ống ly tâm chứa phần còn lại. Lắc đều và thêm 10 ml dung dịch rửa giải (5.11). Lắc đều và cho ly tâm như trên.

Lặp lại qui trình cho đến khi tất cả chất màu đã được chiết khỏi mẫu, sau đó gộp tất cả các dịch chiết.

Cho bay hơi dịch chiết hỗn hợp trên nồi cách thuỷ đến khoảng 25 ml để loại bỏ hết metanol. Đối với indigotin thì sử dụng bình đáy tròn (6.14) và dùng bộ cô quay chân không (6.6) ở 35°C.

Thêm 25 ml nước sôi (xem cảnh báo) và trộn.

9.4. *Chuyển các chất màu sang bột polyamit*

Dùng axit axetic (5.5) hoặc dung dịch amoniac (5.4) để chỉnh pH đến khoảng từ 4 đến 5.

Thêm 1 g bột polyamit (5.13) vào dung dịch còn ấm (xem cảnh báo). Lắc mạnh trong 1 min.

Để bột lắng.

Kiểm tra để biết chắc rằng chất màu không còn trong dung dịch. Nếu dung dịch có màu, thêm một ít bột polyamit và lắc thật mạnh.

Chú thích - Một số chất màu tự nhiên (xem phụ lục B) không hấp phụ hoàn toàn lên bột polyamit, để lại dung dịch có màu ngay cả khi tất cả các chất màu tổng hợp đều hấp phụ hoàn toàn. Thông thường có thể quyết định loại mẫu cho dù có hoặc không có mặt các chất màu tự nhiên như thế.

Lắc và chuyển huyền phù còn ấm vào cột sắc ký (6.7).

Tráng bình đáy phẳng ba lần, mỗi lần bằng 10 ml nước nóng (xem cảnh báo) và cho nước tráng từng phần một sang cột. Rửa tiếp cột ba lần, mỗi lần dùng 10 ml nước nóng (xem cảnh báo) và cuối cùng rửa ba lần mỗi lần bằng 5 ml metanol (5.3). Nếu các chất màu tự nhiên được rửa giải, thì tiếp tục rửa cột bằng metanol cho đến khi metanol được rửa giải mất màu.

9.5. *Rửa giải và cô chất màu đã tách*

Đặt bình (6.4) dưới cột và rửa giải các chất màu ra khỏi bột polyamit bằng các phần 5 ml dung dịch rửa giải (5.11), ở tốc độ dòng thể tích rửa giải là 2 ml/min, cho đến khi polyamit mất màu.

Cho bay hơi chất rửa giải đến khô sử dụng bộ cô quay chân không (6.6) ở nhiệt độ cao nhất là 35°C (xem cảnh báo).

Thêm 1,0 ml hoặc 2,0 ml dung dịch rửa giải (5.11) tùy thuộc vào lượng và số lượng chất màu và hoà tan cặn. Chuyển dung dịch chất màu sang vật chứa bằng chất dẻo (6.8).

9.6. Tách bằng sắc ký lớp mỏng

9.6.1. Tấm đối chứng tiêu chuẩn

Chuẩn bị ba tấm sắc ký lớp mỏng đối chứng tiêu chuẩn. Dùng micropipet (6.10) phân phối từng dung dịch tiêu chuẩn (5.16) mỗi dung dịch một điểm chấm khoảng 5 μ l (đường kính < 5 mm) một cách riêng rẽ lên từng tấm (6.9). Hiện màu từng dung dịch một cách riêng rẽ, mỗi dung dịch dùng một chất rửa giải sắc ký (5.17, 5.18 và 5.19) trong bể chứa bão hoà cho đến khi vết màu trên sắc ký đạt đến khoảng từ 10 cm đến 12 cm so với điểm chấm sắc ký. Lấy các tấm sắc ký ra khỏi bể và làm khô trong không khí dưới tấm che. Bảo quản các tấm này nơi tối. Các điểm chấm này có thể ổn định trong vài năm, trừ trường hợp đối với indigotin.

9.6.2. Mẫu

Dùng micropipet (6.10) lấy một lượng dung dịch mẫu (9.5) vừa đủ để nhìn thấy cho vào tấm sắc ký mỏng (6.9). Dùng máy sấy tóc sấy khô. Trong trường hợp đối với indigotin thì làm khô trong không khí.

Cho hiện màu tấm sắc ký này trong bể chứa bão hoà cho đến khi chiều cao của cột đạt khoảng từ 10 cm đến 12 cm, sử dụng dung dịch sắc ký thích hợp (5.16, 5.17 hoặc 5.18); nghĩa là dung dịch cho tách màu tốt nhất phát hiện được trong mẫu (xem điều 1). Đôi khi cần phải chuẩn bị tấm mẫu thứ hai và cho hiện màu trong một chất rửa giải của hai chất rửa giải khác để thu được sự tách màu tốt nhất.

Lấy tấm sắc ký ra khỏi bể và làm khô trong không khí dưới tấm che.

So sánh các vết chấm mẫu với tấm đối chứng tiêu chuẩn thích hợp (9.6.1).

Khuyến cáo rằng, nên sử dụng các lượng khác nhau của các dung dịch mẫu trong trường hợp hỗn hợp các chất màu, vì các chất màu có thể có mặt với các nồng độ khác nhau trong trạng thái cô đặc.

Sự hiện màu không tốt thường do sự làm sạch không đủ. Nếu vậy, hấp phụ lại chất màu bằng chất hấp phụ, rửa trong nước nóng và lấy chất hấp phụ ra như mô tả ở trên.

9.7. Thử khẳng định

Thử khẳng định các chất màu đã nhận biết bằng cách chạy sắc ký mẫu cô đặc (9.6.2) trong hỗn hợp các chất chuẩn dùng cho các chất màu đã được nhận biết trong sắc ký đồ ban đầu.

Nếu còn nghi ngờ, rửa giải chất màu từ tấm sắc ký bằng dung dịch trung tính (nước hoặc etanol, hoặc 0,2 g/l dung dịch amoni axetat), axit (0,1 mol/l axit clohidric) và kiềm (0,1 mol/l dung dịch natri hidroxit) và so sánh sắc phổ hấp thụ của chất màu với sắc màu hấp thụ của chất chuẩn. Xem sắc phổ hấp thụ trong phụ lục C.

10. Báo cáo thử nghiệm:

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ:

- Mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- Phương pháp lấy mẫu đã dùng, nếu biết;
- Phương pháp đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- Mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chỉ tiêu bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- Kết quả thử nghiệm thu được.

PHỤ LỤC A
(Tham khảo)

CÁC TỪ ĐỒNG NGHĨA VÀ SỐ NHẬN BIẾT CÁC SẢN PHẨM MÀU TỔNG HỢP
TAN TRONG NƯỚC

Bảng A.1

Tên	Từ đồng nghĩa 1	Từ đồng nghĩa 2	C.I. ^a	ENo. ^b
Tartrazin	FD & C Yellow No.5		19140	E 102
Quinolin Yellow			47005	E 104
Sunset Yelow FCF	FD & C Yellow No.6		15985	E 110
Amaranth	FD & C Red No.2	Naphtol Red S	16185	E 123
Ponceau 4R	New coccin	Cochineal Red A	16255	E 124
Erytroxin	FD & C Red No.3		45430	E 127
Patent Blue V			42051	E 131
Idigotin	FD & C Blue No.2		73015	E 132
Brilliant Black PN			28440	E 151
Black 7984			27755	E 152
Fast Green FCF	FD & C Blue No.3		42053	^c
Blue VRS			2045	^c

^a C.I.: Số nhận biết theo chỉ số màu [4]
^b E No: Số hiệu hiện hành trong ủy ban Châu âu (EC)
^c ENo: Chưa có sẵn

PHỤ LỤC B

(Qui định)

KHẢ NĂNG GÂY NHIỄU BỞI CÁC CHẤT MÀU**B.1. Các chất màu không gây nhiễm**

các chất màu thực vật hoặc các chất chiết suất từ th vật sau đây không gây nhiễm đến phương pháp này:

Alfalfa	Nhựa cây ốt
Annatto (bixin và norbixin)	vitamin B ₂
Anthoxyanin	cúc vạn thọ
β -caroten	củ cải đường đỏ
β -apocarotenal	mù tạc
Este etyl axit β - carotenic	hoa cúc vạn thọ
Cantharathin	chè
Clorophyl	cà chua
Phức chất đồng của clorophyllin	

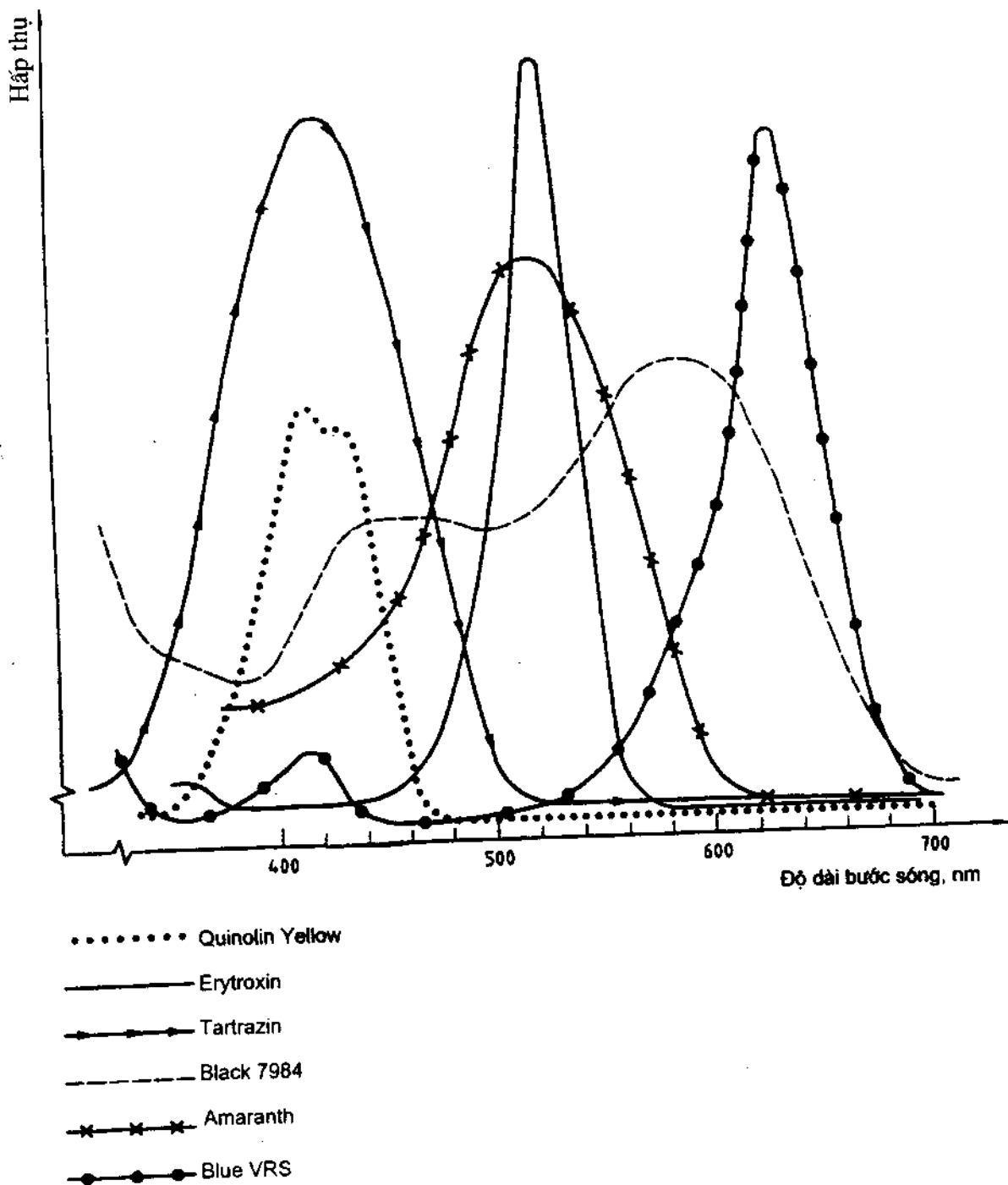
B.2. Các chất màu có thể gây nhiễm

Trong một số trường hợp, các chất màu tự nhiên cho thấy có gây nhiễm đến phương pháp này. Việc sử dụng chúng trong thực phẩm và việc xác định các chất màu tổng hợp có thể bị ảnh hưởng được đưa ra trong bảng B.1.

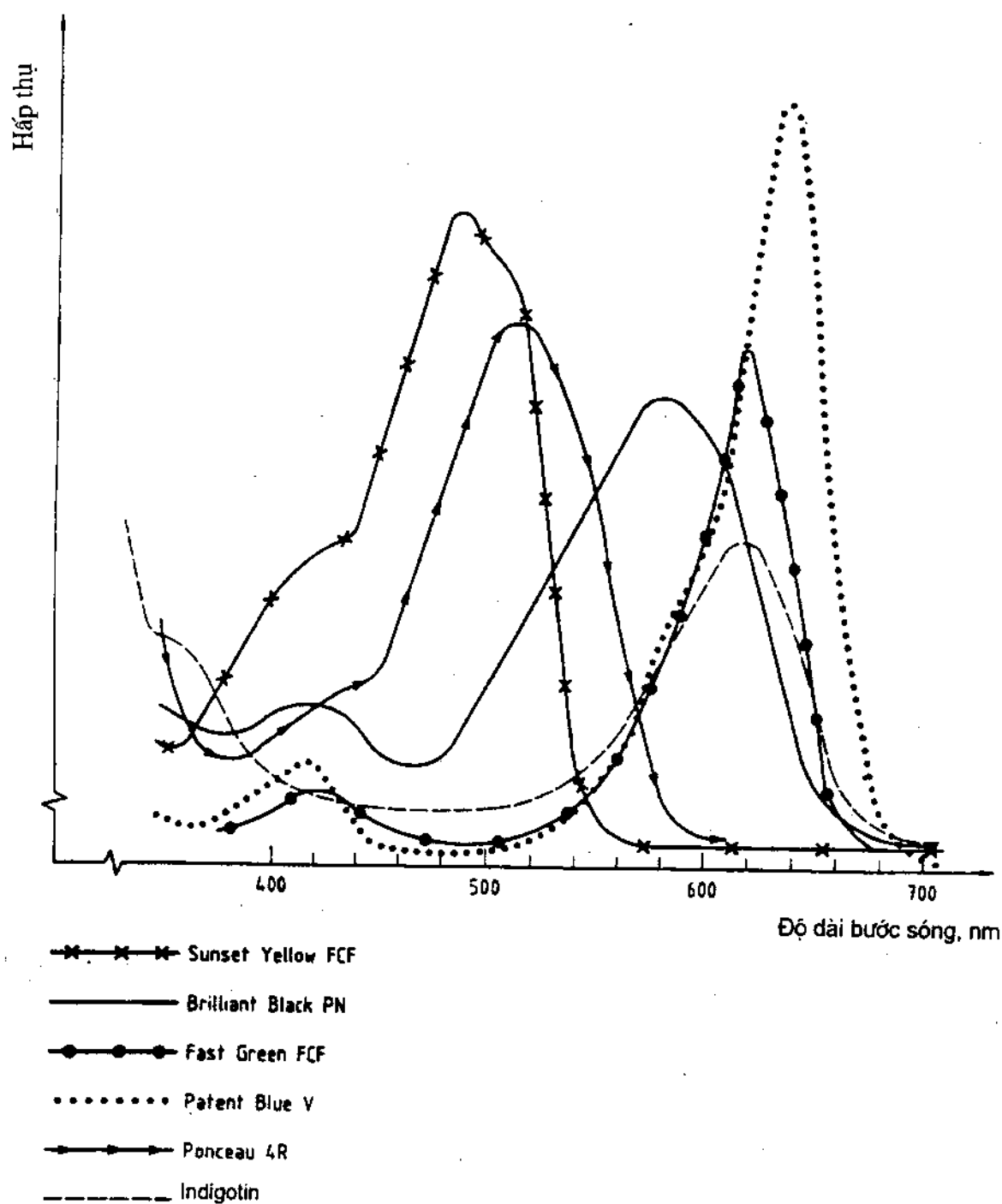
Bảng B.1

Chất	Sử dụng trong thực phẩm	Gây nhiễm cho phép phân tích
Nghệ	Gia vị, cũng được dùng làm phẩm màu yellow	Quinolin Yellow (E 104) ^a Brilliant Black PN (E 151) ^a Black 7984 (E 152) ^a
Saffran	Gia vị (quá đắt để sử dụng làm phẩm màu)	Erytoxin (E 127) ^b Quinolin Yellow (E 104) ^a Brilliant Black PN (E 151) ^a Black 7984 (E 152) ^a
Safflor	Thay thế cho saffran	Tartrazin (E 102) ^b
^a Gây nhiễm ít và có thể bỏ qua		
^b Để tránh hoặc giảm gây nhiễm do safflor hoặc saffran, nên sử dụng dịch sắc ký II (5.18)		

PHỤ LỤC C
(Tham khảo)
SẮC PHỔ HẤP THỤ



Hình C1. Sắc phổ hấp thụ của amaranth, Black 7984, Blue VRS, Erytroxin, Tartrazin và Quinolin Yellow



Hình C2. Sắc phổ hấp thụ của Brilliant Black PN, Fast green FCF, Indigotin, Patent Blue V, Ponceau 4R và Sunset Yellow FCF

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT

Xác định phospho tổng số - Phương pháp quang phổ

Meat and meat products - Determination of total phosphorus content
Spectrometric method

TCVN 7141: 2002 hoàn toàn tương đương với ISO 13730: 1996;

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng phospho tổng số trong tất cả các loại thịt và sản phẩm thịt, kể cả thịt gia cầm. Các kết quả chính xác được trích dẫn trong phương pháp này chỉ liên quan đến xúc xích chế biến.

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 7142 : 2002 (ISO 936), Thịt và sản phẩm thịt - Phương pháp xác định tro tổng số.

3. Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa sau:

3.1. **Hàm lượng phospho tổng số của thịt và sản phẩm thịt** (total phosphorus content of meat products): Phần khối lượng của phospho pentoxit xác định được theo qui trình quy định trong tiêu chuẩn này, biểu thị bằng phần trăm khối lượng mẫu thử.

4. Nguyên tắc

Sấy khô phần mẫu thử và nung phần chất khô còn lại. Sau khi làm nguội, thủy phân tro bằng axit nitric. Lọc và pha loãng bằng hỗn hợp amoni monovanadat và amoni heptamolidat để tạo thành một hợp chất có màu vàng. Đo bằng phương pháp so màu ở bước sóng 430 nm.

5. Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử cấp tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước loại khoáng hoặc ít nhất là nước có độ tinh khiết tương đương.

5.1. **Axit nitric**, pha loãng 1+2 (V/V).

Trộn 1 thể tích axit nitric [65% (m/m), $\rho_{20} = 1,40$ g/ml] với 2 thể tích nước.

5.2. **Dung dịch amoni monovanadat** (NH_4VCO_3), 2,5 g/l.

Hoà tan 2,5 g amoni monovanadat vào trong 500 ml nước sôi. Làm nguội và chuyển từng lượng vào bình định mức 1000 ml (6.7). Thêm 20 ml axit nitric (5.1). Pha loãng bằng nước đến vạch và lắc đều.

5.3. **Dung dịch amoni heptamolybdat** [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$], 50 g/l.

Hoà tan 50 g amoni heptamolybdat ngâm 4 phân tử nước vào khoảng 800 ml nước ấm (khoảng

50°C). Làm nguội và chuyển từng lượng vào bình định mức 1000 ml. Pha loãng bằng nước đến vạch và lắc đều.

5.4. Thuốc thử hiện màu

Trộn một thể tích axit nitric (5.1) với một thể tích dung dịch amoni monovanadat (5.2).

Sau đó thêm một thể tích dung dịch amoni heptamolybdat (5.3) vào hỗn hợp trên và lắc đều. Thuốc thử hiện màu cần phải chuyển từ màu vàng nhạt đến không màu hoàn toàn.

5.5. Dung dịch phosphat gốc, $c(P) = 218 \text{ mg/l}$, $c(P_2O_5) = 500 \text{ mg/l}$.

Hoà tan trong nước 958,8 mg kali dihydro phosphat (KH_2PO_4) đã được sấy khô trong 3 giờ ở nhiệt độ $103^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ và để nguội trong bình hút ẩm.

Chuyển từng lượng vào bình định mức 1000 ml (6.7). Pha loãng bằng nước đến vạch và lắc đều.

5.6. Dung dịch phosphat tiêu chuẩn, có nồng độ từ 0,05 mg đến 0,30 mg P_2O_5 trên mililit.

Dùng pipet hoặc buret để lấy vào các bình định mức 100 ml (6.7) các thể tích dung dịch phosphat gốc (5.5) lần lượt là 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml và 60 ml. Thêm vào mỗi bình 10 ml axit nitric (5.1). Pha loãng bằng nước đến vạch và lắc đều.

5.7. Dung dịch thử mẫu trắng

Dùng pipet lấy 2 ml axit nitric (5.1) và 30 ml thuốc thử hiện màu (5.4) cho vào bình định mức 100 ml (6.7). Pha loãng bằng nước cất đến vạch và lắc đều.

6. Thiết bị và dụng cụ

Chú thích - Tất cả các dụng cụ thủy tinh phải được làm sạch kỹ bằng thuốc tẩy có khả năng loại bỏ hoàn toàn các hợp chất phosphat, sau đó phải được tráng rửa lại bằng nước cất.

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm thông thường và đặc biệt sau:

6.1. **Thiết bị đồng hoá mẫu dùng điện hoặc cơ**, có thể đồng hoá mẫu phòng thử nghiệm. Thiết bị này gồm máy cắt quay tốc độ cao, hoặc máy xay gắn một tấm đục lỗ với đường kính lỗ không quá 4,5 mm (xem thêm điều 8).

6.2. **Nồi cách thuỷ**, có khả năng duy trì nhiệt độ ở 100°C .

6.3. **Giấy lọc gấp nếp**, đường kính 15 cm, không chứa phosphat.

6.4. **Phổ kế**, có khả năng làm việc ở bước sóng $430 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ hoặc máy so màu quang điện với bộ lọc giao thoa có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng $430 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$.

6.5. **Cuvet thuỷ tinh**, độ dài đường quang là 10 mm.

6.6. **Cân phân tích**, có thể cân chính xác đến $\pm 0,001 \text{ g}$.

6.7. **Bình định mức một vạch**, dung tích 100 ml và 1000 ml.

6.8. **Lò múp**

Các quy định chi tiết về lò múp và các dụng cụ, thiết bị khác để thực hiện quy trình nung xem TCVN 7142 : 2002 (ISO 936).

7. Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 4833 - 1 : 2002 (ISO 3100- 1)

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

Mẫu đại diện phải có khối lượng ít nhất là 200 g.

Bảo quản mẫu sao cho tránh làm giảm chất lượng và thay đổi thành phần của mẫu.

8. Chuẩn bị mẫu thử

Đồng hoá mẫu phòng thử nghiệm bằng thiết bị thích hợp (6.1). Phải khống chế để nhiệt độ của mẫu thử không vượt quá 25°C. Nếu dùng máy xay, thì phải thực hiện quá trình xay ít nhất hai lần.

Cho mẫu thử đã được chuẩn bị vào một vật chứa kín khí phù hợp, đậy nắp và bảo quản trong các điều kiện thích hợp để không làm hỏng mẫu hoặc làm biến đổi thành phần mẫu thử. Tiến hành phân tích mẫu thử càng sớm càng tốt, nhưng thông thường là trong vòng 24 giờ sau khi đồng hoá.

9. Cách tiến hành

Chú thích - Nếu phải kiểm tra sự thoả mãn của độ lặp lại (11.1), thì thực hiện hai phép xác định độc lập theo 9.1 đến 9.3.

9.1. Phần mẫu thử

Cân khoảng 5 g mẫu thử đã chuẩn bị chính xác $\pm 0,001$ g

9.2. Tiến hành xác định

9.2.1. Hoá tro phần mẫu thử (9.1) bằng lò múp (6.8) và sử dụng phương pháp mô tả trong TCVN 7142: 2002 (ISO 936).

9.2.2. Cho 10 ml dung dịch axit nitric (5.1) vào phần tro thu được, dùng que khuấy để khuấy.

9.2.3. Đậy đĩa bằng mặt kính đồng hồ và đun nóng 30 phút trong nồi cách thuỷ đun sôi (6.2). Sau đó để nguội và chuyển lượng chất lỏng sang bình định mức 100 ml (6.7). Pha loãng bằng nước đến vạch, lắc đều và lọc dung dịch qua giấy lọc (6.3), loại bỏ từ 5 ml đến 10 ml dịch lọc đầu tiên.

9.2.4. Dùng pipet lấy 20 ml dịch lọc trong và không màu cho vào bình định mức 100 ml (6.7), dùng pipet hoặc buret thêm vào 30 ml thuốc thử hiện màu (5.4). Pha loãng bằng nước đến vạch và lắc đều, sau đó để yên ít nhất 15 phút.

9.2.5. Đo độ hấp thụ ở bước sóng $430 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ trong cuvet thuỷ tinh (6.5) so sánh với dung dịch mẫu thử trắng (5.7), sử dụng phổ kế hoặc máy so màu quang điện có bộ lọc giao thoa (6.4).

9.2.6. Đọc nồng độ phospho của dung dịch mẫu thu được từ đường chuẩn như mô tả trong (9.3) tương ứng với độ hấp thụ ánh sáng đo được.

9.3. Đường chuẩn

9.3.1. Dùng pipet lấy từng dung dịch phosphat tiêu chuẩn (5.6), cho vào các bình định mức 100 ml (6.7) mỗi bình 20 ml dung dịch. Thêm tiếp vào mỗi bình 30 ml thuốc thử màu (5.4). Pha loãng bằng nước đến vạch để thu được các nồng độ P_2O_5 tương ứng trong một mililit là 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ và 60 $\mu\text{g/ml}$. Lắc đều và để yên ít nhất 15 phút.

9.3.2. Thực hiện các thao tác đo đúng trình tự tiến hành theo qui trình mô tả trong 9.2.5.

9.3.3. Dựng đồ thị các giá trị hấp thụ đo được, đã được hiệu chỉnh đối với giá trị thử mẫu trắng so với các nồng độ các dung dịch tiêu chuẩn phosphat đã pha loãng (9.1.3). Dựng đường thẳng đi qua gốc tọa độ và sát nhất với tất cả các điểm thu được.

Đối với mỗi loạt mẫu phân tích phải dựng một đường chuẩn mới.

10. Tính toán kết quả

Tính hàm lượng phospho tổng số, tính theo phospho pentoxit, biểu thị bằng phần trăm khối lượng mẫu thử, được tính theo công thức sau:

$$\frac{c}{20m}$$

Trong đó

c là nồng độ phospho pentoxit của dung dịch mẫu (9.2.4), được đọc từ đường chuẩn, tính bằng microgam trên mililit;

m là khối lượng của phần mẫu thử (9.1) tính bằng gam.

Lấy kết quả làm tròn đến 3 chữ số sau dấu phẩy.

11. Độ chụm

Độ chụm của phương pháp thu được từ kết quả thử liên phòng thử nghiệm (xem tài liệu tham khảo [3,4]), chỉ áp dụng cho xúc xích chế biến, được tiến hành theo ISO 5725 (tài liệu tham khảo [2]).

11.1. Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn độc lặp thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau trong một phòng thử nghiệm, do một người thực hiện sử dụng cùng thiết bị, trong khoảng một thời gian ngắn không lớn hơn 0,0070% (m/m)

11.2. Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn độc lặp thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do các nhà phân tích khác nhau sử dụng các thiết bị khác nhau không lớn hơn 0,0117% (m/m)

12. Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- Phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- Phương pháp đã sử dụng;
- Kết quả thu được; và
- Nếu kiểm tra độ lặp lại, nêu kết quả cuối cùng thu được;
- Tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT

Xác định tro tổng số

Meat and meat products - Determination of total ash

TCVN 7142: 2002 hoàn toàn tương đương với ISO 936: 1998;

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng tro tổng số trong tất cả các loại thịt và sản phẩm thịt, kể cả thịt gia cầm.

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 4851 - 89 (ISO 3696 :1987), nước dùng để phân tích trong phòng thử nghiệm - Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.

3. Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa sau:

- 3.1. **Hàm lượng tro tổng số của thịt và sản phẩm thịt (total ash from meat and products):** Khối lượng của tro thu được sau khi nung mẫu thử ở nhiệt độ $(550 \pm 25)^{\circ}\text{C}$, chia cho khối lượng mẫu thử, dưới các điều kiện thao tác quy định trong tiêu chuẩn này.

Chú thích - Phần khối lượng tro thường được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm.

4. Nguyên tắc

Làm khô phần mẫu thử, đốt, sau đó nung mẫu ở nhiệt độ $(550 \pm 25)^{\circ}\text{C}$. Sau khi để nguội, xác định khối lượng của tro.

5. Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử cấp tinh khiết phân tích, trừ khi có qui định khác.

- 5.1. **Nước**, ít nhất phải sử dụng nước phù hợp với loại 3 của TCVN 4851 - 89 (ISO 3696).

- 5.2. **Hydro peroxit**, 30%.

6. Thiết bị và dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm thông thường và đặc biệt như sau:

- 6.1. **Thiết bị đồng hoá mẫu**, sử dụng điện hoặc cơ, có khả năng đồng hoá mẫu phòng thử nghiệm.

Thiết bị này gồm máy cắt quay tốc độ cao, hoặc máy xay gắn một tấm đục lỗ với các lỗ có đường kính không quá 4,0 mm (xem điều 8).

- 6.2. **Đĩa**, đáy phẳng, được làm bằng sứ, thạch anh hoặc kim loại (thí dụ niken, platin, thép không gỉ) hoặc các vật liệu khác không ảnh hưởng đến các điều kiện tiến hành phép thử. Đường kính của đĩa tối thiểu là 60 mm, và chiều cao của đĩa tối thiểu là 25 mm.

- 6.3. Lò múp**, đốt nóng bằng điện và có hệ thống kiểm soát nhiệt độ theo thời gian (có bộ phận đặt chương trình), có khả năng duy trì nhiệt độ ở $(550 \pm 25)^{\circ}\text{C}$.
- 6.4. Bình hút ẩm**, có chứa chất làm khô hiệu quả cao.
- 6.5. Cân phân tích**, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.
- 6.6. Tủ sấy**, có khả năng duy trì ở nhiệt độ $(103 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ (nếu tủ sấy không có bộ phận kiểm soát thời gian và nhiệt độ).
- 6.7. Bếp điện hoặc bếp ga** (nếu lò múp không có bộ phận kiểm soát thời gian và nhiệt độ).

7. Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 4833 - 1: 2002 (ISO 3100 - 1 [1]).

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

Mẫu đại diện được lấy ít nhất là 200 g thịt và sản phẩm thịt. Bảo quản sao cho không làm giảm chất lượng và làm thay đổi thành phần của mẫu.

8. Chuẩn bị mẫu thử

Đồng hoá mẫu thử nghiệm bằng thiết bị thích hợp (6.1). Phải khống chế để nhiệt độ của mẫu thử không vượt quá 25°C . Nếu dùng máy xay, thì phải thực hiện quá trình xay ít nhất hai lần.

Cho mẫu thử đã được chuẩn bị vào một dụng cụ chứa kín, phù hợp, đậy nắp và bảo quản trong các điều kiện thích hợp để tránh làm hỏng mẫu hoặc làm biến đổi thành phần mẫu thử. Tiến hành phân tích mẫu thử càng sớm càng tốt nhưng thường trong vòng 24 giờ sau khi đã đồng hoá.

9. Cách tiến hành

Chú thích - Nếu phải kiểm tra sự thoả mãn của giới hạn lặp lại (xem 11.2), thì thực hiện hai phép xác định độc lập theo 9.1 đến 9.3.

9.1. Phân mẫu thử

Đốt nóng đĩa (6.2) bằng lò múp (6.3) ở nhiệt độ 550°C trong 20 phút.

Làm nguội đĩa trong bình hút ẩm (6.4) đến nhiệt độ phòng và cân (m_0) bằng cân phân tích (6.5) chính xác đến 0,1 mg.

Chuyển 1,5 g đến 2 g mẫu đã chuẩn bị vào đĩa (xem điều 8). Dần đều mẫu và cân lại khối lượng đĩa chứa mẫu (m_1) chính xác đến 0,1 mg.

Chú thích - Nếu người phân tích thấy hợp lý, khi đã xem xét đến bản chất của mẫu phòng thử nghiệm, thì có thể lấy đến 5 g mẫu thử đã chuẩn bị. Điều này phải nêu trong báo cáo thử nghiệm.

Nếu lò múp có bộ phận đặt chương trình để kiểm soát nhiệt độ và thời gian thì tiến hành theo (9.2), nếu không thì tiến hành theo 9.3.

9.2. Xác định trong trường hợp lò múp có bộ phận kiểm soát nhiệt độ theo thời gian.

Đặt đĩa chứa mẫu vào lò múp (6.3) lúc nguội và tăng dần nhiệt độ của lò lên đến $(550 \pm 25)^{\circ}\text{C}$ trong vòng từ 5 h đến 6 h. Tiếp tục hóa tro ở nhiệt độ $(550 \pm 25)^{\circ}\text{C}$ cho đến khi xuất hiện tro màu xám trắng.

Lấy đĩa ra khỏi lò múp và làm nguội trong bình hút ẩm (6.4) đến nhiệt độ phòng.

Cảnh báo - Tránh để hao hụt tro khi chuyển đĩa chứa tro từ lò múp sang bình hút ẩm và từ bình hút ẩm đến cân phân tích.

Kiểm tra tro

Nếu tro còn màu đen thì xử lý bằng cách nhỏ vào vài giọt hydroperoxit (5.2) hoặc nước (5.1) sau đó lặp lại trình tự tiến hành như mô tả trên (điều 9.2).

Nếu tro có màu xám trắng, thì cân khối lượng đĩa chứa tro (m_2) bằng cân phân tích (6.5), chính xác đến 0,1 mg, thực hiện theo điều 10.

9.3. *Xác định trong trường hợp lò múp không có bộ phận kiểm soát nhiệt độ theo thời gian.*

Đặt đĩa chứa mẫu vào tủ sấy (6.6) ở nhiệt độ 103°C trong 1h.

Lấy đĩa ra khỏi tủ sấy đem đi hoá tro bằng bếp điện hoặc bếp ga (6.7). Gia nhiệt từ từ cho đến khi mẫu bị than hoá và sinh khói. Tiếp tục đốt cháy mẫu một cách thận trọng cho đến khi mẫu không còn sinh khói, lúc này mẫu thử không thể bắt lửa hay bốc cháy tiếp.

Chuyển đĩa đã đốt vào lò múp (6.3) lúc còn nguội và tăng nhiệt độ lên 550°C ± 25°C.

Sau 4 giờ, lấy đĩa chứa mẫu ra khỏi lò và làm nguội đến nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm (6.4).

Cảnh báo - Tránh để hao hụt tro khi chuyển đĩa chứa tro từ lò nung sang bình hút ẩm và từ bình hút ẩm đến cân phân tích.

Kiểm tra tro.

Nếu tro còn màu đen thì xử lý bằng cách nhỏ vào vài giọt hydroperoxit (5.2) hoặc nước (5.1) sau đó lặp lại trình tự tiến hành như mô tả trên (điều 9.2).

Nếu tro có màu xám trắng, thì cân khối lượng đĩa chứa tro (m_2) bằng cân phân tích (6.5), chính xác đến 0,1 mg.

10. Tính toán

Hàm lượng tro của mẫu thử được tính bằng công thức sau:

$$w_a = \frac{(m_2 - m_o)}{(m_1 - m_o)} \times 100\%$$

Trong đó

w_a là khối lượng tro của mẫu thử nghiệm, tính bằng phần trăm;

m_o là khối lượng của đĩa trống, tính bằng gam;

m_1 là khối lượng của đĩa chứa phần mẫu thử, tính bằng gam;

m_2 là khối lượng của đĩa chứa tro, tính bằng gam;

Kết quả được làm tròn chính xác đến 0,01%.

11. Độ chụm

11.1. *Thử liên phòng thử nghiệm*

Độ chụm của phương pháp thu được từ kết quả thử liên phòng thử nghiệm theo (ISO 5725) [2].

Các kết quả thử liên phòng thử nghiệm đã được công bố (xem tài liệu tham khảo [6]). Không áp dụng các giá trị thu được từ phép thử này cho các dải hàm lượng và các matrix khác với chúng.

11.2. *Độ lặp lại*

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn độc lặp thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau trong một phòng thử nghiệm, do một người thực hiện sử dụng cùng thiết bị, trong khoảng một thời gian ngắn vượt quá giá trị giới hạn của độ lặp lại r không lớn hơn 5% các trường hợp, tính theo công thức dưới đây:

$$r = 0,0990\% + 0,00933 \bar{w}$$

Trong đó

r là giới hạn lặp lại, tính bằng phần trăm;

$\bar{w}$ là giá trị trung bình của hai kết quả, tính bằng phần trăm.

11.3. Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn độc lập thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do các nhà phân tích khác nhau sử dụng các thiết bị khác nhau vượt quá giá trị giới hạn của độ tái lập R không lớn hơn 5% các trường hợp, tính theo công thức dưới đây.

$$R = 0,138 \% + 0,0046 \bar{w}$$

Trong đó

R là giới hạn độ tái lập, tính bằng phần trăm;

$\bar{w}$ là giá trị trung bình của hai kết quả, tính bằng phần trăm.

12. Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- Mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- Phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- Phương pháp thử đã dùng, viện dẫn theo tiêu chuẩn này;
- Tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- Kết quả thử thu được; hoặc
- Nêu kết quả cuối cùng thu được, nếu kiểm tra độ lặp lại.

PHỤ LỤC A

(Tham khảo)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] TCVN 4833-1 : 2002 (ISO 3100-1:1991), Thịt và sản phẩm thịt - Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử - Phần 1 : Lấy mẫu.
- [2] ISO 5725: 1986, Precision of test methods - Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory test.
- [3] TCVN 6910 -1 : 2001 (ISO 5725-1:1994), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 1- Nguyên tắc và định nghĩa chung.
- [4] TCVN 6910 - 2 : 2001 (ISO 5725-2:1994), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.
- [5] Method No 23 (1991). Moisture and Ash: Gravimetric Determination in Meat and Meat producta. Nordic Committee on Food Analysis (NMKL), Espoo. Finland (in English and Scandinavian). (UDC 637.5).
- [6] Kolar, K. Gravimetric Determination of Moisture and Ash in Meat and Meat products: NMKL Interlaboratory Study. JAOAC, 75, 1992, phương pháp. 1016-1022.

TIÊU CHUẨN CHĂN NUÔI
PHẦN 2: SẢN PHẨM CHĂN NUÔI
II - TRỨNG

TRỨNG VỊT ẤP

Duck egg for breeding

Tiêu chuẩn này áp dụng đối với các loại trứng vịt ấp, không áp dụng cho trứng để ăn và trứng để chế biến.

1. Yêu cầu chung

- 1.1. Trứng ấp được lấy từ cơ sở chăn nuôi có đủ những yêu cầu sản xuất trứng ấp.
- 1.2. Trứng ấp được lấy từ những đàn vịt sinh sản có độ tuổi không ít hơn 7 tháng tuổi đối với giống vịt có khối lượng lớn hơn như vịt Bắc Kinh, vịt Bầu, vịt Anh Đào và không ít hơn 6 tháng tuổi đối với giống có khối lượng nhỏ như vịt cỏ, vịt kỳ lừa.
- 1.3. Trứng ấp phải sạch nhưng không được rửa sau khi nhặt ở chuồng về.
- 1.4. Trứng vịt ấp không được để lẫn với trứng loại ra và với các loại trứng gia cầm khác.
- 1.5. Trứng loại không đưa vào ấp gồm trứng dập vỡ, trứng quá nhỏ, quá to, trứng bẩn, trứng dị hình, trứng để lâu, trứng có phẩm chất xấu, quá mỏng vỏ, trứng không phôi, chết phôi (được phát hiện trong quá trình ấp)
- 1.6. Ở các trại vịt giống gốc, cấp I, II cần bảo đảm cho trứng được sạch sẽ và có tẩy trùng trứng ấp bằng xông hơi phoóc môn từ ngày đầu khi vịt mới đẻ.

2. Yêu cầu kỹ thuật

- 2.1. Trứng ấp phải đạt các yêu cầu ghi ở bảng 1 dưới đây:

Bảng 1

Tên chỉ tiêu	Yêu cầu
1. Vỏ	Sạch sẽ, không sần sùi, không có mẩn vôi trên vỏ trứng, không có vết rạn nứt. Những vết bẩn nhỏ do dính phân hoặc đất phải được chùi khô
2. Hình dạng	Căn đối không được quá tròn hoặc quá dài hoặc méo mó
3. Khối lượng	Vịt cỏ từ 55 g đến 75 g Vịt Bầu từ 62 g đến 90 g Vịt Bắc kinh từ 65g đến 95g
4. Trạng thái buồng khí	Buồng khí ở đầu to quả trứng Loại bỏ những trứng có buồng khí nằm ở đầu nhỏ và bên cạnh trứng.
5. Lòng đỏ	Khi soi thấy ở khoảng giữa quả trứng, trứng tốt thấy lòng đỏ có màu thẫm và chuyển động chậm
6. Lòng trắng	Đặc trong suốt, không có máu, thịt và dị vật lẫn vào. Trứng xấu khi soi thấy lòng đỏ chuyển động nhanh và chìm xuống dưới do lòng trắng loãng và dây chằng yếu.

Ban hành theo Quyết định số 75/QĐ ngày 22 tháng 4 năm 1982 của Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước.

3. Phương pháp thử

- 3.1. Lấy mẫu ngẫu nhiên khoảng 5% số trứng vịt ấp khi giao nhận, ít nhất là 50 quả.
- 3.2. Cách kiểm tra

Bảng 2

Tên chỉ tiêu	Cách kiểm tra
Vỏ, hình dạng	Bằng cảm quan
Khối lượng	Bằng cách cân từng quả bằng loại cân có độ chính xác $\pm 1g$
Buồng khí, lòng đỏ, lòng trắng	Soi bằng ánh sáng mạnh trong buồng tối, có thể đập ra quan sát nếu nghi ngờ.

4. Ghi nhận, bao gói, vận chuyển và bảo quản

- 4.1. Trứng ấp được đánh dấu rõ ràng bằng bút chì hay bút màu, có số hiệu và ký hiệu về giống, ngày đẻ... theo sự thoả thuận giữa hai bên giao và nhận.
- 4.2. Nơi bảo quản trứng ấp cần thoáng mát tránh ánh nắng chiếu trực tiếp vào trứng. Nhiệt độ nơi bảo quản, nếu có máy điều hoà nhiệt độ là 8-12°C. Nếu bảo quản bình thường thì không nên vượt quá 25°C với độ ẩm: 65-75%.
4. Khi bảo quản trứng xếp đầu to của trứng lên phía trên. Thời gian bảo quản trứng ấp về mùa hè không vượt quá 5 ngày và về mùa đông không vượt quá 7 ngày kể từ khi trứng đẻ ra.
- 4.3. Trứng ấp được xếp vào bao bì chuyên dùng, cũng có thể dùng lồng, sọt, thùng chở trứng ấp trong điều kiện chuyên chở gần. Trên bao bì chuyên chở trứng ấp cần có ký hiệu phòng ngừa hình ô và cốc.
- 4.4. Trứng ấp cần được chuyên chở bằng xe chuyên dùng, nếu vận chuyển gần có thể dùng các phương tiện vận tải thông thường. Xe được làm sạch trước khi chuyên chở. Khi vận chuyển trên đường, cần tránh những ảnh hưởng xấu về đường như gồ ghề... và những ảnh hưởng xấu về thời tiết như quá nóng, bí hơi và gió lùa.
- 4.5. Khi chuyển trứng ấp phải có phiếu giao nhận ghi rõ những nội dung sau đây:
- Số lượng trứng và tên giống vịt
 - Tên người và cơ sở giao hàng;
 - Ngày trứng đẻ ra;
 - Ngày giao hàng.

TRỨNG VỊT TƯƠI - THƯƠNG PHẨM*Fresh duck egg*

Tiêu chuẩn này thay thế TCVN 1442-73, áp dụng cho các loại trứng vịt tươi tiêu thụ trong nước.

1. Khái niệm**1.1. Trứng tươi:**

Trứng theo đúng yêu cầu của tiêu chuẩn này.

1.2. Trứng loại ra:

Trứng nhìn bề ngoài hoặc khi soi không đạt yêu cầu của tiêu chuẩn này.

Trứng loại ra gồm các dạng sau:

- 1.2.1. Trứng bẩn: trên vỏ trứng bị bẩn do máu phân bùn đất hay do trứng khác vỡ chảy vào chiếm một phần ba bề mặt vỏ trứng.
- 1.2.2. Trứng đã rửa: Trứng đã rửa nước hay chùi khô, làm cho lớp màng ngoài vỏ trứng mất đi.
- 1.2.3. Trứng rạn nứt: Trứng có vết rạn nứt nhỏ thành đường hay rạn chân chim trên bề mặt vỏ.
- 1.2.4. Trứng dập: Trứng bị dập vỏ vôi nhưng không rách màng lụa.
- 1.2.5. Trứng non: Trứng vỏ mềm do khi để thiếu lớp vỏ vôi.
- 1.2.6. Trứng méo mó: Trứng có vỏ vôi không đúng với dạng tự nhiên.
- 1.2.7. Trứng cũ: Trứng có buồng khí to không bảo đảm yêu cầu như quy định ở mục 3.
- 1.2.8. Trứng có máu hay thịt: Trứng khi đem soi, ở phần lòng đỏ và lòng trắng có máu hay thịt đường kính không quá 3mm.
- 1.2.9. Trứng có bọt khí: Trứng khi đem soi thấy có bọt khí di động tự do.
- 1.2.10. Trứng chiếu 1: Trứng đã ấp từ 5 đến 7 ngày phải loại ra do trứng không có phôi hoặc chết phôi.

1.3. Trứng hỏng

Trứng không dùng làm thực phẩm bán ngoài thị trường mà phải qua chế biến hoặc làm thức ăn chăn nuôi.

Trứng hỏng gồm các dạng sau:

- 1.3.1. Trứng vỡ: Trứng vỡ cả vỏ vôi và vỏ lụa, lòng đỏ, lòng trắng có thể chảy ra ngoài.

Ban hành theo quyết định số 379/QĐ ngày 22 tháng 10 năm 1986 của ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước

- 1.3.2. Trứng bẩn nhiều: Trứng bị bẩn trên một phần ba bề mặt vỏ trứng.
- 1.3.3. Trứng có vòng máu:
- Trứng đã bảo quản ở nhiệt độ cao, phôi phát triển nửa chừng rồi chết để lại một vòng máu to hay nhỏ.
- 1.3.4. Trứng ấp dở: Trứng đã đem vào ấp, phôi đã phát triển rồi chết.
- 1.3.5. Trứng ám: Trứng khi soi có màu đen thẫm ở sát vỏ trứng.
- 1.3.6. Trứng vữa: Trứng loãng lòng khi soi thấy những vẩn đen nhờn nhờn, vàng, đỏ hay biến màu xanh.
- 1.3.7. Trứng thối: Vỏ trứng biến màu xanh thẫm, khi đập ra có mùi khó ngửi.

2. Phân hạng

2.1. Phân hạng theo khối lượng

Bảng 1.

Hạng	Khối lượng một quả (g)	Sai lệch cho phép
I	Từ 65 trở lên	
II	Từ 55 đến dưới 65	
III	Dưới 55	±1

2.2. Tỷ lệ lẫn loại cho phép

Trứng tươi khi xuất cho người tiêu thụ, cho phép lẫn tối đa 2% trứng loại ra (không kể trứng rạn nứt) và cho phép lẫn tối đa 5% trứng rạn nứt không được lẫn trứng hồng.

3. Yêu cầu kỹ thuật

3.1. Trứng vịt tươi phải theo đúng yêu cầu ghi trong bảng 2.

Bảng 2.

Tên chỉ tiêu	Nhập từ nơi sản xuất	Xuất cho người tiêu thụ
Mùi	Không có mùi lạ	
Vỏ	Không méo mó, sạch, không rửa, không chùi, không vỡ	
Buồng khí	Không cao quá 6 mm	Không cao quá 9 mm
Lòng đỏ	Khi xoay không lệch khỏi tâm quả trứng	Khi xoay cho phép lệch khỏi tâm quả trứng một ít
Lòng trắng	Trong, đặc sền sệt	Trong, không được loãng quá

3.2. Mỗi lô trứng khi giao nhận phải kèm theo một giấy chứng nhận chất lượng.

4. Phương pháp thử

Theo TCVN 4300 - 86.

5. Ghi nhãn, bao gói, vận chuyển, bảo quản

5.1. Ghi nhãn:

Mỗi thùng trứng phải có nhãn dính kèm, nội dung ghi:

Tên cơ sở sản xuất;

Tên và hạng trứng;

Ngày giao nhận;

Số lượng trứng;

Khối lượng tịnh và khối lượng cả bì của mỗi thùng;

Ký hiệu và số hiệu của tiêu chuẩn này.

5.2. Bao gói

Các phương tiện bao gói (thùng giấy, khay hay lồng sọt chuyên dùng để đựng trứng) phải sạch khô, không có mùi lạ, và phải lót chất êm xốp.

5.3. Vận chuyển

Các phương tiện vận chuyển phải êm sạch khô và không có mùi lạ. Xe phải có mui che mưa nắng, đồng thời phải thoáng khí. Khi bốc dỡ và vận chuyển phải tránh mọi va chạm mạnh gây đập vỡ. Dụng cụ đựng trứng... phải chèn chặt để không xô dịch và chạm vào nhau. Xung quanh thành xe phải chèn bằng chất đệm êm dày 20-30 mm.

5.4. Bảo quản

Phải có kho riêng để bảo quản trứng. Nơi bảo quản phải khô, sạch, thoáng khí, tránh mưa hắt và ánh nắng mặt trời trực tiếp vào, tránh chuột bọ xâm nhập. Không được để lẫn với các mặt hàng khác.

TRỨNG GÀ TƯƠI - THƯƠNG PHẨM*Fresh chicken egg*

Tiêu chuẩn này thay thế TCVN 1858- 76 áp dụng cho các loại trứng tươi của gà công nghiệp, tiêu thụ trong nước.

1. Khái niệm**1.1. Trứng tươi:**

Trứng theo đúng yêu cầu của tiêu chuẩn này.

1.2. Trứng loại ra:

Trứng nhìn bề ngoài hoặc soi khi không đạt yêu cầu của tiêu chuẩn này.

Trứng loại ra gồm các dạng sau:

- 1.2.1. Trứng bẩn: Trên vỏ trứng bị bẩn do máu, phân, bùn đất hay do trứng khác vỡ chảy vào chiếm một phần ba bề mặt vỏ trứng.
- 1.2.2. Trứng đã rửa: Trứng đã rửa nước hay chùi khô làm cho lớp màng ngoài vỏ trứng mất đi.
- 1.2.3. Trứng rạn, nứt: Trứng có vết rạn, nứt nhỏ thành đường hay rạn chân chim trên bề mặt vỏ.
- 1.2.4. Trứng đập: Trứng bị đập vỡ vôi nhưng không rách màng lụa
- 1.2.5. Trứng non: Trứng có vỏ mềm do khi đẻ bị thiếu lớp vỏ vôi
- 1.2.6. Trứng méo mó: Trứng có vỏ vôi không đúng với dạng tự nhiên.
- 1.2.7. Trứng cũ: Trứng có buồng khí to, không đảm bảo yêu cầu như quy định ở mục 3.
- 1.2.8. Trứng có máu hay thịt: Trứng khi đem soi ở phần lòng đỏ và lòng trắng có máu hoặc thịt đường kính không quá 3mm.
- 1.2.9. Trứng có bọt khí: Trứng khi đem soi thấy có bọt khí di động tự do.

1.3. Trứng hỏng

Trứng không dùng làm thực phẩm bán ngoài thị trường mà phải qua chế biến hoặc làm thức ăn chăn nuôi.

Trứng hỏng gồm các dạng sau:

- 1.3.1. Trứng vỡ: Trứng vỡ cả vỏ vôi và vỏ lụa, lòng đỏ, lòng trắng có thể chảy ra ngoài
- 1.3.2. Trứng bẩn nhiều: Trứng bị bẩn trên một phần ba bề mặt vỏ trứng.

Ban hành theo quyết định số 739/QĐ ngày 22 tháng 10 năm 1986 của ủy ban Khoa học và kỹ thuật Nhà nước

- 1.3.3. Trứng có vòng máu: Trứng đã bảo quản ở nhiệt độ cao, phôi phát triển nửa chừng rồi chết để lại một vòng máu to hay nhỏ.
- 1.3.4. Trứng ấp dờ: Trứng đã đem vào ấp, phôi đã phát triển rồi chết.
- 1.3.5. Trứng ám: Trứng khi soi thấy có màu đen thẫm ở sát vỏ trứng.
- 1.3.6. Trứng vữa: Trứng loãng lòng, khi soi thấy những vẩn đen nhờ nhờ, vàng, đỏ hoặc biến màu xanh.
- 1.3.7. Trứng thối: Vỏ trứng biến màu xanh thẫm, khi đập ra có mùi khó ngửi.

2. Phân hạng

2.1. Phân hạng theo khối lượng

Bảng 1

Hạng	Khối lượng một quả (g)	Sai lệch cho phép
I	Từ 55 trở lên	± 1
II	Từ 45 đến dưới 55	

2.2. Tỷ lệ lẫn loại cho phép

Trứng tươi khi xuất cho người tiêu thụ cho phép lẫn tối đa 2% trứng loại ra (không kể trứng rạn nứt) và cho phép lẫn tối đa 5% trứng rạn nứt, không được lẫn trứng hỏng.

3. Yêu cầu kỹ thuật

3.1. Trứng gà tươi phải đúng yêu cầu ghi trong bảng 2.

Bảng 2

Chỉ tiêu	Nhập từ nơi sản xuất	Xuất cho người tiêu thụ
Mùi	Không có mùi lạ	
Vỏ	Không méo mó, sạch, không rửa, không chùi, không vỡ	
Buồng khí	Không cao quá 5 mm	Không cao quá 8 mm
Lòng đỏ	Khi xoay không lệch khỏi tâm quả trứng	Khi xoay cho phép lệch khỏi tâm quả trứng một ít
Lòng trắng	Trong, đặc sền sệt	Trong, không được loãng quá

3.2. Mỗi lô trứng khi giao nhận phải kèm theo một giấy chứng nhận chất lượng.

4. Phương pháp thử

Theo TCVN 4300 - 86 (trứng gà giống và trứng vịt giống. Phương pháp thử)

5. Ghi nhãn, bao gói, vận chuyển, bảo quản

5.1. Ghi nhãn: Mỗi thùng trứng phải có nhãn dính kèm, nội dung ghi:

- a/ Tên cơ sở sản xuất;
- b/ Tên, và hạng trứng;
- c/ Ngày giao nhận;
- d/ Số lượng trứng;
- e/ Khối lượng tịnh và cả bì của mỗi thùng;
- g/ Ký hiệu và số hiệu của tiêu chuẩn này.

5.2. Bao gói

Các phương tiện bao gói (thùng giấy, khay hay dụng cụ chuyên dùng để đựng trứng) phải sạch, khô, không có mùi lạ và phải lót chất êm, xốp.

5.3. Vận chuyển

Các phương tiện vận chuyển phải êm sạch, khô và không có mùi lạ. Xe phải có mui che mưa, nắng, đồng thời phải thoáng khí. Khi bốc dỡ và vận chuyển phải tránh mọi va chạm mạnh gây đập vỡ. Dụng cụ đựng trứng phải chèn chặt để không xô dịch, va chạm vào nhau. Xung quanh thành xe phải chèn bằng chất đệm êm, dày 20-30 cm.

5.4. Bảo quản

Phải có kho riêng để bảo quản trứng. Nơi bảo quản phải khô, sạch, thoáng khí, tránh mưa hắt và ánh nắng mặt trời chiếu trực tiếp, tránh chuột bọ xâm nhập. Không được để lẫn với các mặt hàng khác.

TRỨNG GÀ GIỐNG VÀ TRỨNG VỊT GIỐNG**Phương pháp thử***Breeding eggs - Test methods*

Tiêu chuẩn này áp dụng cho các loại trứng gà và trứng vịt để ấp làm giống.

1. Lấy mẫu

- 1.1. Lô hàng đồng nhất là lượng trứng sản xuất ở cùng một cơ sở, thuộc cùng một giống gà hoặc vịt, với cùng một dạng bao gói và được giao nhận cùng một lúc.
- 1.2. Mẫu trứng được xếp vào thùng, mỗi thùng trứng có 12 khay trứng, mỗi khay trứng đựng 30 quả trứng, số lượng thùng để lấy mẫu được quy định ở bảng 1.

Bảng 1, thùng

Số thùng trong một lô	Số thùng để lấy mẫu
Không quá 20	Không quá 3
21-50	Không quá 6
51-100	Không quá 12
Trên 100	Không quá 12%

Ở mỗi thùng để lấy mẫu, lấy ở 3 vị trí khác nhau, mỗi vị trí không quá 10 quả.

- 1.3. Nếu trứng không được xếp vào thùng thì căn cứ vào số lượng trứng để lấy mẫu theo bảng 2.

Bảng 2, quả

Số lượng trứng của một lô hàng	Số lượng trứng lấy mẫu
Đến 7200	Không quá 90
Trên 7200 đến 18000	Không quá 180
Trên 18000 đến 36000	Không quá 360
Trên 36000	1%

- 1.4. Trước khi lấy mẫu cần xác định tình trạng bên ngoài của bao gói (hình dạng, mức độ sạch, số liệu ghi bên ngoài).
- 1.5. Biên bản lấy mẫu cần ghi rõ:

Ban hành theo quyết định số 739 /QĐ ngày 22 tháng 10 năm 1986 của ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước

- Tên cơ sở sản xuất (hay đơn vị giao hàng);
- Tên trứng và hạng chất lượng;
- Ngày sản xuất và ngày giao hàng;
- Nơi và ngày lấy mẫu;
- Tên người lấy mẫu.

Các mẫu đã lấy không được để lẫn.

- 1.6. Tránh làm hư hỏng, đập vỡ mẫu. Mẫu dùng để phân tích vi sinh vật phải được bao gói bằng giấy sạch và chuyển ngay đến phòng thí nghiệm. Nếu chưa gửi ngay được phải giữ trứng ở nhiệt độ 4-5°C.

2. Phương pháp thử

2.1. Xác định hình dạng:

Đặt trứng thành hàng, quan sát bằng mắt và đánh giá độ chênh lệch so với hình dạng bình thường của quả trứng.

2.2. Xác định khối lượng:

Dùng cân có độ chính xác $\pm 1g$ để cân trứng. Sau đó chia trứng đã cân thành từng loại theo từng cặp khối lượng.

2.3. Xác định độ sạch của vỏ:

Xác định bằng mắt độ sạch vỏ trứng. Nếu bẩn nhiều chia trứng làm 8 phần bằng nhau để đánh giá tỷ lệ diện tích bẩn so với cả diện tích của vỏ.

2.4. Xác định tình trạng của trứng:

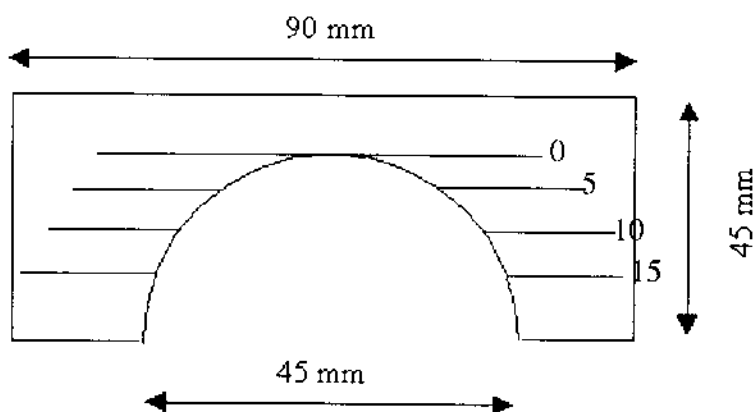
Nhúng trứng vào dung dịch axit oxalic 8-10% hay axit axetic 8-10% để kiểm nghiệm. Nếu thấy có nhiều vết vạch trắng là trứng chưa qua tẩy rửa, nếu hoàn toàn không có vạch trắng hoặc hơi có là trứng đã qua tẩy rửa.

2.5. Xác định sự rạn nứt của vỏ:

Giữ trứng rồi gõ vào bề mặt vỏ nghe tiếng động khi gõ. Nếu rạn, đập thì phát ra tiếng đục. Có thể soi qua ánh sáng mạnh để phát hiện vết rạn nứt.

2.6. Xác định độ cao buồng hơi:

Soi trứng nơi có ánh sáng mạnh trong buồng tối, dùng thước đo độ cao buồng hơi (theo hình vẽ). Chiều cao buồng hơi được tính bằng milimét, sai số không quá 1mm.



2.7. Xác định vị trí buồng hơi:

Xác định bằng mắt khi soi, đánh giá xem vị trí buồng hơi có lệch khỏi vị trí bình thường không; hình dạng buồng hơi bình thường hay đứt đoạn, toàn vẹn hay bị phá vỡ màng, buồng hơi yên tĩnh hay chuyển động.

2.8. Xác định độ đặc quánh của lòng trắng:

Trứng soi qua ánh sáng mạnh, quay trứng và quan sát sự chuyển động của lòng đỏ. Nếu chuyển động chậm và không chìm xuống phía dưới nhiều là lòng trắng đặc và quánh.

2.9. Xác định độ trong của lòng đỏ và sự phát triển của phôi trứng:

Trứng soi qua ánh sáng mạnh, quay nhẹ và xem có dị vật trong trứng hay không. Nếu phôi phát triển sớm trước khi ấp có thể thấy có vết máu hay tia máu phát triển trên bề mặt lòng đỏ.

2.10. Xác định chất lượng bên trong của trứng:

Trứng được đập vỡ bằng dao sắc, chém cẩn thận trên phần giữa vỏ theo trục ngang, tránh phá hoại lòng trắng và lòng đỏ, rồi để trứng nhẹ nhàng ra đĩa thủy tinh rộng đáy bằng; ở phía dưới đĩa đặt giấy đen cho dễ nhìn.

Bằng mắt thường đánh giá chất lượng lòng trắng, lòng đỏ và sự phát triển của phôi. Lòng đỏ dày cao, lòng trắng dày quánh trong, phôi không phát triển thành vòng máu hay vết máu là trứng tốt.

Kết hợp thử mùi vị của trứng để đánh giá.

2.11. Xác định nấm mốc trong trứng:

Trứng đem rửa sạch bằng khăn, xà phòng và nước ấm. Sau đó ngâm vào ethanol 70° trong mười phút. Trứng lấy ra để khô, dùng dao đã khử trùng để đập vỡ trứng ở phần đầu nhọn một lỗ rộng khoảng 1 cm, sau đó đổ trứng ra lọ có cổ rộng đã khử trùng. Đổ hết lòng đỏ, lòng trắng ra rồi khuấy đều bằng que thủy tinh đã khử trùng làm cho trứng thành đồng nhất.

Đổ 1 ml mẫu trên ra đĩa petri đã có thạch và để ở nhiệt độ 40-45°C. Rồi cho đĩa vào tủ ẩm ở nhiệt độ 25°C. Sau 2 ngày mang ra kiểm tra, nếu mẫu nhiễm nấm mốc thì đã nhìn thấy được nấm đã mọc, nếu chưa thấy nấm mốc thì để đến 7 ngày mang ra kiểm tra lại. Cần đánh giá theo tập đoàn nấm mốc. Nếu có nấm mốc phát triển, chứng tỏ trong trứng có nấm mốc.

**TUYỂN TẬP TIÊU CHUẨN
NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM**

TIÊU CHUẨN CHĂN NUÔI
PHẦN 2: SẢN PHẨM CHĂN NUÔI
III - SỮA

SỮA

Định lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc từ các vi sinh vật ưa lạnh - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 6,5°C

*Milk - Enumeration of colony-forming units of psychrotrophic
micro-organisms - Colony-count technique at 6,5°C*

TCVN 6261 : 1997 hoàn toàn tương đương với ISO 6730 : 1992 (E);

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) từ vi sinh vật ưa lạnh trong sữa nguyên liệu và sữa đã xử lý nhiệt bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 6,5°C.

2. Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 7218 : 1985 Vi sinh vật học - Hướng dẫn chung về kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989) Sữa và các sản phẩm sữa - Chuẩn bị mẫu thử và các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh.

ISO 707 : 1985 Sữa và các sản phẩm sữa - Các phương pháp lấy mẫu.

TCVN 4550 : 1988 (ISO 5725) Độ chính xác của các phương pháp thử nghiệm - Xác định độ lặp lại và độ tái lập cho phương pháp thử chuẩn bằng các phương pháp thử của liên phòng thí nghiệm.

3. Định nghĩa

Áp dụng định nghĩa sau đây trong tiêu chuẩn này:

3.1. Vi sinh vật ưa lạnh - Các vi khuẩn, nấm men và nấm mốc dưới các điều kiện qui định trong tiêu chuẩn này tạo thành các khuẩn lạc có thể đếm được.

4. Nguyên tắc

4.1. Chuẩn bị các đĩa nuôi cấy, sử dụng môi trường nuôi cấy và một lượng mẫu thử xác định. Chuẩn bị các đĩa khác trong cùng một điều kiện, với các dung dịch pha loãng thập phân từ mẫu thử.

4.2. Nuôi cấy các đĩa 10 ngày, trong môi trường có không khí ở 6,5°C.

4.3. Tính số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc từ các vi sinh vật (CFU) trong 1 mililít mẫu thử từ số khuẩn lạc thu được trên các đĩa đã chọn ở các mức pha loãng sao để có được kết quả thỏa đáng.

5. Dịch pha loãng và môi trường nuôi cấy

5.1. Khái quát

Hướng dẫn chung, xem ISO 7218.

5.2. Nguyên liệu chính

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989).

5.3. Chất pha loãng để dùng cho các mục đích chung

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989).

5.4. Phân phối, khử trùng và bảo quản

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989).

5.5. Môi trường nuôi cấy**5.5.1. Thành phần**

Tripton	5,0 g
Cao men	2,5 g
Glucôza ngâm 1 phân tử nước ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	1,0 g
Sữa bột gầy ¹⁾	1,0 g
Thạch	10 g đến 15 g ²⁾
Nước	1000ml

1) Sữa bột gầy không được chứa các chất ức chế. Điều này phải được kiểm tra bằng thử so sánh dùng sữa bột gầy đã biết trước là không chứa các chất này.

2) Tùy theo độ đông của thạch.

5.5.2. Chuẩn bị**5.5.2.1. Chuẩn bị từ môi trường hoàn chỉnh khô thương phẩm**

Tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất, nhưng trong mọi trường hợp, phải cho thêm sữa bột gầy ngay cả khi nhà sản xuất coi việc thêm như vậy là không cần thiết.

Nếu cần, chỉnh pH để sau khi khử trùng, pH là 7,0 ở 25°C.

5.5.2.2. Pha chế từ các thành phần chính khô

Hòa tan và phân tán trong nước theo trình tự sau: cao men, tripton, glucôza và cuối cùng là sữa bột gầy.

Chú thích 1 - Nước được hâm nóng sẽ giúp cho việc hòa tan tốt hơn.

Cho thêm thạch và đun sôi, khuấy đều cho đến khi thạch tan hoàn toàn, hoặc đun nóng trong nồi hơi nước trong khoảng 30 phút.

Chú thích 2 - Nếu dung dịch không trong thì lọc qua giấy lọc.

Nếu cần, chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng pH là 7,0, ở 25°C.

5.5.2.3. Phân phối, khử trùng và bảo quản

Phân phối môi trường vào các ống nghiệm (6.9) với các lượng từ 12 ml đến 15 ml trong mỗi ống, hoặc vào bình cầu hoặc chai (6.9) với các lượng từ 100 ml đến 150 ml.

Khử trùng bằng nồi hấp (6.1) ở $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ trong 15 phút. Nếu môi trường dùng ngay thì làm nguội đến 45°C trong nồi cách thủy (6.5). Nếu không dùng ngay, trước khi bắt đầu tiến hành thử nghiệm vi sinh, để tránh mọi sự chậm trễ khi rót môi trường, làm tan chảy hoàn toàn môi trường trong nồi cách thủy nóng (6.6) sau đó làm nguội đến 45°C trong nồi cách thủy (6.5). (Xem 8.4.4).

Bảo quản môi trường đã chuẩn bị ở chỗ tối với nhiệt độ từ 0°C đến $+5^\circ\text{C}$ không quá ba tháng.

Chú thích 3 - Để kiểm tra được nhiệt độ của thạch, đặt một nhiệt kế vào một lượng dung dịch 15 g/l thạch được đựng trong một bình riêng biệt giống hệt loại bình để đựng môi trường. Dung dịch kiểm tra nhiệt độ này phải được tiến hành các thao tác tương tự về đun nóng và làm nguội, giống như đối với môi trường nuôi cấy.

6. Thiết bị

Chú ý - Phải khử trùng tất cả các dụng cụ tiếp xúc với mẫu thử, với chất pha loãng, với dung dịch hoặc với môi trường nuôi cấy phù hợp với TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989), (6.1).

Chú thích 4 - Có thể dùng các dụng cụ sử dụng một lần để thay cho các dụng cụ thủy tinh có thể sử dụng nhiều lần, nếu như nó phù hợp với các yêu cầu qui định.

Sử dụng các thiết bị thông thường của phòng thí nghiệm vi sinh, các thiết bị cần thiết để xử lý mẫu thử và các dung dịch pha loãng theo qui định của TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989) và đặc biệt là:

- 6.1. **Thiết bị để khử trùng khô (lò sấy) hoặc khử trùng ướt (nồi hấp áp lực), xem ISO 7218.**
- 6.2. **Tủ ấm**, có khả năng hoạt động ở $6,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- 6.3. **Đĩa Petri** bằng thủy tinh hoặc bằng chất dẻo, đường kính từ 90 mm đến 100 mm.
- 6.4. **Pipét chia độ**, được nhét bông ở đầu, đã hiệu chỉnh dung tích 1 ml $\pm 0,02$ ml, hoặc 10 ml $\pm 0,2$ ml, hoặc 11 ml $\pm 0,2$ ml.
- 6.5. **Nồi cách thủy**, có khả năng hoạt động ở $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 6.6. **Nồi cách thủy**, có khả năng hoạt động từ 100°C trở lên.
- 6.7. **Thiết bị đếm khuẩn lạc**, bao gồm một bộ phận chiếu sáng có nền đen, được gắn với một kính lúp có độ khuếch đại 1,5 lần và có một dụng cụ đếm cơ hoặc điện tử.
- 6.8. **pH mét bù nhiệt**, có độ chính xác tới $\pm 0,1$ đơn vị pH ở 25°C .
- 6.9. **Ống nghiệm có dung tích khoảng 20 ml** (hoặc bình hoặc chai có dung tích thích hợp) và các bình cầu hoặc chai có dung tích từ 150 ml đến 250 ml dùng để khử trùng và bảo quản môi trường nuôi cấy.

Chú thích 5 - Có thể dùng chai hoặc bình cầu có nắp xoáy bằng kim loại không độc.

7. Lấy mẫu

Lấy mẫu theo ISO 707.

8. Cách tiến hành

Chú thích 6 - Để tăng độ chính xác của phương pháp, việc chuẩn bị các dung dịch pha loãng phải được chuẩn hóa cẩn thận. Những yếu tố tác động đến độ chính xác là:

- Kiểu loại thiết bị khuấy trộn;
- Thời gian khuấy trộn;
- Dịch pha loãng;
- Thời gian để cho các hạt to lắng xuống;
- Thời gian khuấy cho phép khi chuẩn bị các dung dịch loãng theo hệ thập phân.

Chú ý - Phải thực hiện các thao tác vô trùng thông thường. Những thao tác quy định trong 8.1 và 8.2 không được tiến hành dưới ánh nắng mặt trời.

8.1. Chuẩn bị mẫu thử và dung dịch pha loãng ban đầu

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO : 1989), 8.1.1.

8.2. Dung dịch pha loãng theo hệ thập phân tiếp theo

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989), 8.2.

Chú thích 7 - Có thể dùng các loại dung dịch pha loãng khác, thí dụ: dung dịch pha loãng ban đầu của 10 ml mẫu thử trong 90 ml chất pha loãng, hoặc 11 ml mẫu thử trong 99 ml chất pha loãng. Độ tập trung và tính chính xác của phương pháp sẽ lớn hơn khi sử dụng lượng mẫu thử và chất pha loãng lớn hơn.

8.3. Thời gian, tiến hành

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989), 8.3.

8.4. Cấy và nuôi cấy

8.4.1. Lấy hai đĩa Petri (6.3) vô trùng. Dùng pipét vô trùng (6.4) cho vào mỗi đĩa 1 ml mẫu thử.

8.4.2. Lấy tiếp hai đĩa Petri vô trùng. Dùng một pipét vô trùng khác cho vào mỗi đĩa 1 ml dung dịch mẫu thử pha loãng 10^{-1} .

8.4.3. Nếu cần, lặp lại thao tác này, sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo.

8.4.4. Kiểm tra nhiệt độ của môi trường nuôi cấy (5.5) không được vượt quá 46°C.

Chú thích 8 - Nếu nhiệt độ của môi trường nuôi cấy lớn hơn 46°C thì có thể làm hư hại hoặc giết chết các vi sinh vật ưa lạnh trong mẫu thử. Nếu cảm thấy có sự hư hại nào đó thì phải kéo dài việc để đĩa và nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ thấp.

Rót vào mỗi đĩa Petri khoảng 12 ml đến 15 ml môi trường nuôi cấy (5.5).

Chú thích 9 - Nếu dùng 15 ml mà không thu được sự phân bố đều của các vi sinh vật thì nên dùng 20 ml.

8.4.5. Khuấy trộn thật kỹ chất cấy với môi trường bằng cách xoay đĩa Petri và để cho hỗn hợp đông đặc bằng cách đặt các đĩa Petri này trên một mặt phẳng nằm ngang, mát.

8.4.6. Thời gian từ khi chuẩn bị dung dịch pha loãng thứ nhất đến khi trộn chất nuôi cấy với môi trường không được vượt quá 15 phút.

8.4.7. Chuẩn bị đủ số đối chứng để kiểm tra độ vô trùng.

8.4.8. Lật ngược các đĩa đã cấy xong và đặt chúng vào tủ ấm (6.2) ở nhiệt độ 6,5°C trong 10 ngày.

Chú thích 10 - Để tránh sự lan rộng, cần phải để phòng như sau:

- Phủ thêm một lớp môi trường nuôi cấy lên mặt các đĩa cấy sau khi đã đông cứng, hoặc
- Nhỏ thêm một giọt glixerol lên trên giấy lọc trong nắp của đĩa.

8.4.9. Không chồng quá 6 đĩa lên nhau. Để các chồng đĩa tách xa hẳn nhau cũng như xa thành và nóc tủ ấm.

8.5. Đọc kết quả

8.5.1. Đếm số khuẩn lạc trong mỗi đĩa (xem 9.1), sử dụng thiết bị đếm khuẩn lạc (6.7).

Kiểm tra các đĩa dưới ánh sáng dịu. Điều này rất quan trọng vì những chấm khuẩn lạc nhỏ cũng phải được đếm nhưng điều cơ bản là người kỹ thuật viên phải tránh lẫn lộn các hạt nhỏ không tan hoặc các chất kết tủa trong đĩa với khuẩn lạc nhỏ. Kiểm tra thật cẩn thận các đốm còn nghi ngờ, dùng kính lúp có độ khuếch đại cao hơn nếu thấy cần, để phân biệt được khuẩn lạc với các chất lạ.

8.5.2. Những khuẩn lạc mọc lan được xem là những khuẩn lạc đơn lẻ. Nếu các khuẩn lạc mọc lan nhưng ít hơn 1/4 bề mặt đĩa thì đếm những khuẩn lạc trên phần còn lại của đĩa và tính số lượng tương ứng cho toàn đĩa. Nếu lan rộng hơn 1/4 bề mặt đĩa thì loại bỏ đĩa đó.

9. Biểu thị kết quả.

9.1. Chỉ giữ lại các đĩa có ít nhất là 10 khuẩn lạc, nhiều nhất là 300 khuẩn lạc.

Tính số CFU từ các vi sinh vật, N, trong 1 mililit sữa theo công thức:

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

$\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trong tất cả các đĩa được giữ lại;

n_1 là số đĩa của độ pha loãng thứ nhất có chứa từ 10 đến 300 khuẩn lạc;

n_2 là số đĩa của độ pha loãng thứ hai có chứa từ 10 đến 300 khuẩn lạc;

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất.

Chú thích 11 – Nếu có nhiều hơn hai độ pha loãng có thể đếm được cho kết quả từ 10 đến 300 khuẩn lạc thì công thức phải được sửa đổi, có tính đến những độ pha loãng tiếp theo đó. Với ba độ pha loãng thì theo công thức:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3)d}$$

Trong đó

n_3 là số đĩa của độ pha loãng thứ ba được giữ lại, có chứa từ 10 đến 300 khuẩn lạc.

Làm tròn số kết quả thu được đến 2 chữ số có nghĩa. Khi số cần làm tròn là 5 mà không có chữ số có nghĩa nào đứng theo sau thì làm tròn số đứng trước chữ số 5 cho thành số chẵn. Thí dụ: 28.500 làm tròn thành 28.000. và 11.500 được làm tròn thành 12.000.

Lấy kết quả là số đơn vị hình thành khuẩn lạc từ các vi sinh vật ưa lạnh CFU trong 1 mililit sữa, biểu thị theo số từ 1,0 đến 9,9 nhân với 10^x , trong đó x là lũy thừa tương ứng của 10.

Thí dụ: Việc đếm khuẩn lạc vi sinh vật cho kết quả sau (hai đĩa Petri cho mỗi độ pha loãng đã được nuôi ủ):

- Độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) được giữ lại chứa 168 và 215 khuẩn lạc

- Độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) được giữ lại chứa 14 và 25 khuẩn lạc.

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{[2 + (0,1 \times 2)]10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19182$$

- Làm tròn kết quả như hướng dẫn trên thu được 19 000 hoặc $1,9 \times 10^4$ CFU vi sinh vật ưa lạnh trong một mililit sữa.

9.2. Nếu có hai đĩa tương ứng với mẫu thử chứa ít hơn 10 khuẩn lạc thì báo cáo kết quả là "ít hơn $10 \times 1/d$ CFU vi sinh vật ưa lạnh trong một mililit sữa", trong đó d là hệ số pha loãng của độ pha loãng thấp nhất.

9.3. Nếu tất cả các đĩa đều chứa nhiều hơn 300 khuẩn lạc thì tính số lượng ước tính từ các đĩa có số khuẩn lạc gần 300 nhất và nhân số này với số nghịch đảo của độ pha loãng cao nhất. Báo cáo kết quả theo "số lượng đơn vị khuẩn lạc vi sinh vật ưa lạnh ước tính trong một mililit sữa".

10. Độ lặp lại

Độ chênh lệch tuyệt đối giữa kết quả thu được từ hai lần thử nghiệm riêng rẽ, khi sử dụng cùng một phương pháp, phân tích trên cùng nguyên liệu, do cùng một người tiến hành trong cùng một phòng thí nghiệm, dùng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được vượt

quá 30% của kết quả thấp hơn.

Chú thích

12) Nếu các trường hợp không thỏa mãn yêu cầu về độ lặp lại là 5% hoặc lớn hơn thì cần xem xét nguồn gốc có khả năng gây ra sai lỗi.

13) Định nghĩa về độ lặp lại, xem TCVN 4550:1988 (ISO 5725).

11. Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả phải chỉ ra phương pháp đã sử dụng và kết quả thử nghiệm thu được, chỉ rõ phương pháp biểu thị. Cũng phải đề cập đến tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả. Báo cáo kết quả cũng bao gồm tất cả mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử.

SỮA VÀ CÁC SẢN PHẨM SỮA**Định lượng Coliform****Phần 1 : Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C***Milk and milk products - Enumeration of Coliforms**Part 1 - Colony count technique at 30°C*

TCVN 6262 - 1 : 1997 hoàn toàn tương đương với ISO 5541 : 1986 (E);

1. Phạm vi và lĩnh vực áp dụng

Phần này của tiêu chuẩn qui định phương pháp định lượng Coliform bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C.

Phương pháp này có thể áp dụng cho:

Sữa và các sản phẩm sữa dạng lỏng;

- Sữa bột, bột của dịch tách ra khi sản xuất phomat có đường, bột bơ loãng và lactoza;
- Casein axit, casein lactic và casein rennet;
- Caseinat, bột của dịch tách ra khi sản xuất pho mát axit;
- Phomat và phomat chế biến;
- Bơ;
- Sản phẩm sữa đông lạnh (bao gồm cả kem lạnh thực phẩm;
- Custard, món tráng miệng và váng kem.

Phương pháp này thích hợp đối với các mẫu dự tính có số lượng Coliform lớn (trên 100 Coliform trong một gam, hoặc 10 Coliform trong một mililit).

Chú thích - Đối với các mẫu có số lượng Coliform nhỏ hơn (ít hơn 100 Coliform trong một gam hoặc 10 coliform trong một mililit) xem TCVN 6262-2 : 1997 (ISO 5541 - 2).

2. Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 707 Sữa và các sản phẩm sữa - Các phương pháp lấy mẫu.

ISO 4832 Vi sinh vật học - Hướng dẫn chung về đếm Coliform - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C.

TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261) Sữa và các sản phẩm sữa - Chuẩn bị mẫu thử và các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh.

3. Định nghĩa

Áp dụng định nghĩa sau đây cho phần này của tiêu chuẩn:

Coliform: Là các vi khuẩn ở nhiệt độ 30°C tạo thành các khuẩn lạc đặc trưng và có thể lên men lactoza kèm theo sự sinh hơi trong các điều kiện thao tác đã mô tả.

4. Nguyên tắc

4.1. Trộn một phần mẫu thử xác định, hoặc một loạt dung dịch mẫu pha loãng theo hệ thập phân với môi trường nuôi cấy trong đĩa Petri và phủ bằng một lớp môi trường đổ lên bề mặt.

4.2. Nuôi ươm ở 30°C trong 24 giờ.

4.3. Đếm các khuẩn lạc đặc trưng, và nếu thấy cần thiết, khẳng định khuẩn lạc bằng tính lên men lactoza, cho thấy sinh hơi.

4.4. Tính số Coliform có trong một mililit hoặc có trong một gam mẫu nguyên chất.

5. Chất pha loãng và môi trường.

5.1. Nguyên liệu chính

Để làm tăng độ tái lập của kết quả, nên sử dụng các thành phần chính khô, hoặc các môi trường hoàn chỉnh khô để chuẩn bị các chất pha loãng và các môi trường nuôi cấy. Cần tuân thủ nghiêm ngặt các hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các hoá phẩm sử dụng phải đạt chất lượng phân tích.

Nước sử dụng phải là nước được cất bằng dụng cụ thuỷ tinh hoặc sử dụng nước đã khử ion. Nước này không được chứa các chất có thể ức chế sự sinh trưởng của các vi sinh vật trong các điều kiện thử đã nêu. Điều này phải được kiểm tra định kỳ, đặc biệt khi sử dụng nước khử ion.

Dùng các dung dịch natri hidroxit và axit clohidric (nồng độ $\approx 0,1$ mol/l) để điều chỉnh pH của chất pha loãng và môi trường nuôi cấy.

5.2. Chất pha loãng dùng cho mục đích chung

5.2.1. Dung dịch pepton/muối

Chú thích - Dung dịch pepton/muối là chất pha loãng do tổ chức ISO chọn dùng cho mục đích chung.

Thành phần

Pepton	1,0 g
Natri clorua	8,5 g
Nước	1 000 ml

Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước, đun nóng nếu cần. Chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,0 \pm 0,1$, ở 25°C.

5.2.2. Dung dịch Ringer nồng độ một phần tư

Thành phần

Natri clorua (NaCl)	2,25 g
Kali clorua (KCL)	0,105 g
Canxi clorua khan (CaCl_2)	0,06 g
Natri hidro cacbonat (NaHCO_3)	0,05 g
Nước	1000 ml

Chuẩn bị

Hoà tan các muối trong nước. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $6,9 \pm 0,1$, ở 25°C .

5.2.3. Dung dịch pepton

Thành phần

Pepton	1,0 g
Nước	1000 ml

Chuẩn bị

Hoà tan pepton trong nước. Điều chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,0 \pm 0,1$, ở 25°C .

5.2.4. Dung dịch đệm photphát

Thành phần

Ka li dihydro photphát (KH_2PO_4)	42,5 g
Nước	1000 ml

Chuẩn bị

Hoà tan muối trong 500 ml nước. Điều chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,2 \pm 0,1$, ở 25°C . Pha loãng tới 1000 ml. Bảo quản dung dịch gốc này từ 0°C đến 5°C .

Thêm 1,00 ml dung dịch này vào 1000 ml nước.

5.3. Chất pha loãng dùng cho các mục đích riêng biệt

5.3.1. Dung dịch natri xitrat (dùng đối với trường hợp phomat, phomat chế biến và sữa sấy màng) .

Thành phần

Trinatri xitrat ngậm 2 phân tử nước . ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	20 g
Nước	1000 ml

Chuẩn bị

Hoà tan muối trong nước bằng cách đun nóng từ 45°C đến 50°C . Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH, là $7,5 \pm 0,1$, ở 25°C .

5.3.2. Dung dịch dikali hidrophotphat (dùng đối với trường hợp phomat, phomat chế biến, casein, casein axit, bột casein lactic, casein rennet, caseinat, bột của dịch tách ra khi sản xuất photphat axit và sữa sấy màng).

Thành phần

Dikali hidro photphat (K_2HPO_4)	20 g
Nước	1000 ml

Chuẩn bị

Hoà tan muối trong nước bằng cách đun nóng từ 45°C đến 50°C . Chỉnh pH. Đối với dung dịch pha loãng ban đầu của casein axit và casein lactic, sau khi khử trùng pH phải là $8,4 \pm 0,1$, ở 25°C . Còn đối với các caseinat, phomat, phomat chế biến, bột của dịch tách ra khi sản xuất photphat axit, và sữa sấy màng, sau khi khử trùng pH phải là $7,5 \pm 0,1$, ở 25°C .

5.4. Phân phối, khử trùng và bảo quản chất pha loãng

Phân phối chất pha loãng (5.2 hoặc 5.3) dùng cho độ pha loãng ban đầu vào các bình hoặc các chai (6.4). Phân phối chất pha loãng dùng cho các độ pha loãng thập phân tiếp theo (5.2) vào

các ống nghiệm hoặc các lọ (6.6). Lượng được phân phối sau khi khử trùng chứa trong mỗi bình hoặc chai phải chứa 90 ml chất pha loãng, hoặc một bội số của 90 ml, và mỗi ống nghiệm hoặc lọ (6.6) phải chứa 9,0 ml chất pha loãng, hoặc một bội số của 9,0 ml (hoặc các lượng khác theo yêu cầu). Đậy nắp các ống nghiệm, bình cầu hoặc các chai.

Khử trùng bằng hấp áp lực ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút (đối với các thể tích lớn hơn có thể phải hấp lâu hơn). Nếu chất pha loãng không sử dụng ngay, bảo quản ở chỗ tối từ 0°C đến 5°C , nhưng không quá 1 tháng trong các điều kiện không làm thay đổi thể tích hoặc thành phần của chúng.

5.5. Môi trường nuôi cấy

5.5.1. Thạch mật, lactoza, tím, đỏ (VRBL), (môi trường đặc chọn lọc)

Thành phần

Pepton	7,0 g
Cao men	3,0 g
Lactoza ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$)	10 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Muối mật	1,5 g
Đỏ trung tính	0,03 g
Tím tinh thể	0,002 g
Thạch	12 - 18 g (tuỳ hãng sản xuất)
Nước	1000 ml

Chuẩn bị.

Tiến hành như sau để giữ được tính chọn lọc và tính đặc thù của môi trường này: hoà các thành phần trên, hoặc môi trường hoàn chỉnh khô như trên vào nước và để yên trong vài phút. Tiếp theo trộn mạnh hỗn hợp và chỉnh pH, sao cho sau khi đun sôi pH là $7,4 \pm 0,1$, ở 25°C . Vừa đun môi trường đến sôi thỉnh thoảng vừa khuấy đều, có thể dùng một loại máy khuấy nào đó. Giữ môi trường sôi trong 2 phút. Phân phối môi trường thành từng lượng 100 - 150 ml vào các bình nón vô trùng (6.5). Làm nguội ngay môi trường trong bể điều nhiệt (6.15) ở $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Tránh đun môi trường quá nóng hoặc quá lâu (hoặc đun lại). Do đó không khử trùng môi trường bằng hấp áp lực và nên kiểm tra độ vô trùng của môi trường khi sử dụng (xem 8.5.1). Chỉ sử dụng môi trường này trong vòng 3 giờ sau khi chuẩn bị xong.

5.5.2. Môi trường canh thang lactoza - mật - lục sáng, môi trường khẳng định.

Thành phần

Pepton	10 g
Lactoza ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$)	10 g
Mật bò khô	20 g
Lục sáng	0,0133 g
Nước	1000 ml

Chuẩn bị

Hoà các thành phần trên, hoặc môi trường khô trong nước và đun đến sôi.

Nếu thấy cần thiết, chỉnh pH sao cho sau khi đun sôi, pH là $7,2 \pm 0,1$, ở 25°C .

Phân phối môi trường thành từng lượng 10 ml vào các ống nghiệm (6.7) có chứa các ống Durham lộn ngược (6.8).

Khử trùng trong nồi hấp (6.1) ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút. Các ống Durham nói trên không được chứa các bọt khí sau khi thanh trùng.

6. Thiết bị và dụng cụ

Chú thích - Có thể dùng các dụng cụ sử dụng một lần để thay cho các dụng cụ thủy tinh có thể sử dụng nhiều lần, nếu như nó phù hợp với các yêu cầu qui định. Dụng cụ thủy tinh tái sử dụng phải có độ bền tốt khi khử trùng lặp lại và phải trở về mặt hoá học.

Sử dụng các thiết bị thí nghiệm vi sinh thông thường và các dụng cụ đặc biệt sau:

6.1. Thiết bị để khử trùng khô (lò nung), hoặc thiết bị để khử trùng ướt (nồi hấp áp lực) (nồi hấp có thể dùng riêng rẽ hoặc dùng như một phần của thiết bị dùng để chuẩn bị và phân phối môi trường). Thiết bị tiếp xúc với chất pha loãng, mẫu thử, hoặc dung dịch pha loãng, ngoài thiết bị đã khử trùng sẵn, đều phải được khử trùng bằng một trong các phương pháp sau:

- Giữ trong lò từ 170°C đến 175°C không ít hơn 1 giờ;
- Giữ trong nồi hấp áp lực ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ không ít hơn 20 phút.

6.2. Thiết bị đồng hoá mẫu

Có thể sử dụng một trong các thiết bị sau đây:

- Máy trộn quay, có tần số quay từ 8000 đến 45000 vòng trên phút, có cốc đựng mẫu bằng thủy tinh hoặc bằng kim loại gắn với nắp, chịu được các điều kiện khử trùng;
- Máy trộn kiểu nhu động, có các túi bằng chất dẻo vô trùng;
- Cối và chày.

Chú thích - Các cốc đựng mẫu, túi bằng chất dẻo hoặc bộ cối chày phải có đủ dung tích để trộn mẫu với lượng chất pha loãng thích hợp. Nói chung, thể tích của vật đựng phải gấp đôi thể tích của mẫu thử cộng với chất pha loãng.

6.3. Máy khuấy, có khả năng khuấy - trộn 1 ml hoặc 2 ml mẫu thử (trong trường hợp mẫu dạng lỏng), hoặc các dung dịch pha loãng thập phân với 9 ml, hoặc 18 ml chất pha loãng trong ống nghiệm có kích thước thích hợp, để thu được chất huyền phù đồng nhất, và có nguyên tắc vận hành dựa trên chuyển động quay lệch tâm lượng chứa trong ống nghiệm (máy trộn Vortex).

6.4. Bình chứa, có đủ dung tích để chứa 90 ml chất pha loãng dùng để tạo huyền phù gốc, hoặc các bội số của 90 ml, và còn có khoảng trống để trộn.

6.5. Các bình chứa, dung tích 150 ml - 250 ml để đựng môi trường thạch pepton - mật - tím - đỏ trung tính (5.5.1).

6.6. Ống nghiệm (hoặc bình cầu hoặc lọ nhỏ), có dung tích đủ để chứa 10 ml mẫu thử (hoặc bội số của 10 ml, nếu thấy cần) (khi mẫu dạng lỏng) hoặc dung dịch pha loãng ban đầu (đối với các trường hợp khác) hoặc các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo và còn có khoảng trống phía trên để trộn.

6.7. Ống nghiệm có dung tích 20 ml để đựng canh thang lục sáng mật lactoza (5.5.2).

6.8. Ống Durham có kích thước phù hợp với các ống nghiệm (6.7).

6.9. Pipet (được nhét bông ở đầu), dung tích danh định là 1 ml và có lỗ thoát có đường kính từ 2 mm đến 3 mm.

Chú thích - Chỉ sử dụng các pipet có đầu còn nguyên vẹn, tốt nhất là loại chia vạch rõ để dễ nhìn khi hút mẫu.

6.10. Pipet chia độ (được nhét bông ở đầu) có dung tích lớn, thí dụ: 10 ml hoặc 20 ml.

Chú thích - Chỉ sử dụng các pipet có đầu còn nguyên vẹn, tốt nhất là loại chia vạch rõ để dễ nhìn khi hút mẫu.

6.11. Đĩa Petri bằng thủy tinh hoặc bằng chất dẻo có đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

6.12. Bì thủy tinh, có đường kính khoảng 6 mm.

6.13 pH mét, có độ chính xác tới $\pm 0,1$ đơn vị ở nhiệt độ 25°C .

6.14. Cân, có khoảng cân phù hợp và có độ chính xác nằm trong giới hạn 1% khối lượng được cân.

6.15. Nồi cách thủy, có khả năng duy trì nhiệt độ ở $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.16. Nồi cách thủy, có khả năng duy trì nhiệt độ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.17. Tủ ấm, có khả năng duy trì nhiệt độ $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ở bất kỳ điểm nào trong tủ.

7. Lấy mẫu

Xem ISO 707.

8. Cách tiến hành

Chú thích

1) Các thao tác mô tả trong các điều từ 8.1 đến 8.5 không được tiến hành dưới ánh sáng trực tiếp của mặt trời.

2) Luôn luôn phải chú ý đảm bảo vô trùng.

8.1. Chuẩn bị mẫu thử và dung dịch pha loãng ban đầu

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng sao để thu được các đĩa có số khuẩn lạc lớn hơn 10, nếu có thể, và ít hơn 150.

Để tránh làm ảnh hưởng các vi sinh vật do thay đổi nhiệt độ đột ngột, nhiệt độ của chất pha loãng trong quá trình thao tác mô tả dưới đây luôn phải gần bằng nhiệt độ của mẫu thử, trừ khi có qui định khác.

8.1.1. Sữa và các sản phẩm sữa dạng lỏng

Trộn mẫu thử thật kỹ sao cho các vi sinh vật phân bố càng đều càng tốt, bằng cách đảo chiều lọ chứa liên tục 25 lần. Cần phải tránh tạo bọt hoặc để bọt tan hết. Khoảng thời gian từ khi trộn đến khi lấy phần mẫu thử không được quá 3 phút.

Dùng pipet lấy 1 ml mẫu thử và cho vào 9 ml chất pha loãng (5.2) (hoặc lấy 10 ml mẫu thử cho vào 90 ml chất pha loãng hoặc lấy 11 ml mẫu thử cho vào 99 ml chất pha loãng). Lắc dung dịch pha loãng ban đầu này (thí dụ, lắc 25 lần với khoảng di động là 300 mm, trong khoảng 10 giây). Như vậy thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

8.1.2. Sữa bột, bột của dịch tách ra khi sản xuất pho mát có đường, bột bơ loãng và lactoza;

Trộn kỹ lượng chứa trong lọ kín bằng cách lắc và đảo chiều liên tục. Nếu mẫu thử đựng trong lọ kín còn nguyên, quá đầy khó trộn kỹ được thì chuyển sang một lọ chứa to hơn. Trộn đều. Mở nắp, dùng dao trộn lấy phần mẫu thử theo yêu cầu và tiến hành theo chỉ dẫn dưới đây. Đóng nắp hộp lại ngay.

Hâm nóng chai chứa 90 ml chất pha loãng thích hợp tới $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong nồi cách thủy (6.15).

Cân 10 g mẫu thử cho vào một bình thủy tinh thích hợp (thí dụ như cốc có mỏ) và trút dần bột vào lọ pha loãng có chứa chất pha loãng thích hợp (5.2 hoặc, nếu cần đối với sữa sấy màng

dùng chất pha loãng 5.3.1 hoặc 5.3.2 ở pH $7,5 \pm 0,1$). Cách khác, cân 10 g mẫu thử cho trực tiếp vào lọ có chứa chất pha loãng.

Để hoà tan, xoay từ từ lọ cho bột thấm ướt và sau đó lắc lọ 25 lần với khoảng di động là 300 mm, trong khoảng 10 giây. Có thể dùng máy trộn kiểu nhu động (6.2.b) để thay cho việc lắc.

Đặt lọ này vào nồi cách thuỷ trong 5 phút và thỉnh thoảng lắc. Như vậy thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

Chú thích - Để hoà tan được tốt hơn, đặc biệt đối với sữa sấy màng nên sử dụng bi thuỷ tinh (6.12). Nếu sử dụng thì phải cho vào lọ trước khi khử trùng.

8.1.3. Phomat và phomat chế biến

Cân 10 g phomat hoặc phomat chế biến trong đĩa. Chuyển vào cốc chứa của máy trộn quay (6.2.a), hoặc 1 túi đựng của máy trộn kiểu nhu động (6.2.b), hoặc cho vào cối nghiền (6.2.c).

Khi dùng máy trộn quay hoặc máy trộn kiểu nhu động cho thêm 90 ml chất pha loãng (5.2, 5.3.1, hoặc 5.3.2 ở pH $7,5 \pm 0,1$). Trộn cho đến khi phomat phân tán đều (từ 1 phút đến 3 phút). Tốt nhất là phải đảm bảo nhiệt độ của quá trình khuếch tán không vượt quá 40°C , và trong mọi trường hợp không để nhiệt độ vượt quá 45°C . Để cho bột tan hết. Khi dùng cối để nghiền thì cho thêm lượng chất pha loãng tối thiểu và trộn bằng chày để thu được bột nhão đồng nhất không vón cục. Thêm phần chất pha loãng còn lại của tổng 90 ml. Như vậy, thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

8.1.4. Casein axit, casein lactic và casein rennet

Cân 10 g sản phẩm trong đĩa. Chuyển vào 1 lọ pha loãng có chứa bi thuỷ tinh (6.12) và 90 ml chất pha loãng dikali hidro photphat (5.3.2) ở pH 8,4 đối với trường hợp axit casein, casein lactic.

Để yên 15 phút và sau đó tăng nhiệt độ lên $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong nồi cách thuỷ (6.16).

Giữ lọ này ở 37°C thêm 15 phút nữa và lắc mạnh từng đợt. Như vậy thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

Chú thích - Không nên sử dụng máy trộn quay (6.2.a) hoặc máy trộn kiểu nhu động (6.2.b) vì sẽ tạo nhiều bọt.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

8.1.5. Caseinat và bột của dịch tách ra khi sản xuất phomat axit

Cân 10 g sản phẩm vào đĩa. Rót thật chậm lên bề mặt của 90 ml chất pha loãng dikali hirdophotphat (5.3.2) ở pH $7,5 \pm 0,1$ trong lọ pha loãng, lắc hỗn hợp sau mỗi lần rót.

Cách khác, cho sản phẩm khô vào một thể tích tối thiểu chất pha loãng và khuấy bằng dũa thuỷ tinh để thu được khối bột nhão đồng nhất không vón cục. Thêm phần chất pha loãng còn lại của tổng 90 ml chất pha loãng.

Để yên 15 phút và sau đó tăng nhiệt độ lên $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong nồi cách thuỷ (6.16). Giữ lọ ở 37°C thêm 15 phút nữa. Trộn kỹ hỗn hợp bằng máy trộn quay (6.2.a), hoặc máy trộn kiểu nhu động (6.2.b). Để cho bột tan hết trước khi tiếp tục tiến hành. Như vậy thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

8.1.6. Bơ

Cho mẫu thử vào 1 bình chứa đặt trong nồi cách thủy ở $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (6.15). Khuấy cho chóng tan chảy và để cho đến khi mẫu thử vừa tan hết. Lắc và dùng pipet đã sấy nóng đến 45°C để lấy 10 ml cho vào bình có chứa 90 ml chất pha loãng (5.2). Trước mỗi lần lấy phải lắc. Có thể dùng máy trộn kiểu nhu động (6.2.b) để trộn. Như vậy thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

Cách khác, chỉ sử dụng pha nước để pha loãng như sau:

Lấy 50 g phần mẫu thử (có chứa khoảng 8 ml nước) và thêm 42 ml chất pha loãng (5.2.3) đã được hâm nóng đến 45°C . Đặt bình chứa vào nồi cách thủy ở $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (6.15) cho đến khi bơ tan hết. Lắc đều và để cho tách pha không quá 15 phút. Dùng pipet hút lớp phía dưới đáy; 1ml này tương đương với 1 g bơ.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

8.1.7. Sản phẩm sữa đông lạnh (bao gồm cả kem lạnh)

Tiến hành như trường hợp đối với bơ (8.1.6) (cách thứ nhất) nhưng dùng nồi cách thủy ở nhiệt độ không vượt quá 37°C (6.16). Nhiệt độ của mẫu thử không được vượt quá 37°C . Như vậy thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

8.1.8. Custard, món tráng miệng, sữa lên men và váng kem

Cân 10 g sản phẩm cho vào 1 bình (6.4) có chứa bi thủy tinh (6.12).

Đối với custard, món tráng miệng và váng kem ngọt, thêm 90 ml chất pha loãng (5.2) và lắc cho tan.

Đối với sữa lên men và váng kem chua sử dụng chất pha loãng 5.2 hoặc 5.2.3, ở pH $7,5 \pm 0,1$. Có thể sử dụng máy trộn kiểu nhu động (6.2.b). Như vậy thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

8.2. Các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo

Dùng pipet sạch lấy 1 ml dung dịch pha loãng ban đầu cho vào 1 ống nghiệm khác chứa 9 ml chất pha loãng vô trùng, không để pipet tiếp xúc với chất pha loãng. Mỗi lần pha loãng phải sử dụng một pipet mới.

Cách khác, lấy 10 ml dung dịch pha loãng ban đầu cho vào 1 lọ chứa 90 ml chất pha loãng vô trùng, hoặc 11 ml dung dịch pha loãng ban đầu cho vào lọ chứa 99 ml chất pha loãng vô trùng. Trong cách tiến hành bình thường, nếu cần dung dịch pha loãng 10^{-3} , lấy 1 ml dung dịch pha loãng ban đầu cho vào 99 ml chất pha loãng vô trùng.

Trộn cẩn thận, hoặc bằng cách dùng pipet sạch hút thả 10 lần, hoặc dùng máy trộn cơ học (6.3) trong khoảng từ 5 giây đến 10 giây để thu được để thu được dung dịch pha loãng 10^{-2} . Phải chọn tần số quay của máy trộn cơ học cao cho chất lỏng tạo thành dòng khi xoáy dâng cao từ 20 mm đến 30 mm trên thành bình chứa.

Khi cần, lặp lại các thao tác này sử dụng dung dịch pha loãng 10^{-2} và các dung dịch pha loãng tiếp theo để thu được các dung dịch pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} v.v... cho đến khi thu được số lượng vi sinh thích hợp (xem 8.1).

Khi lấy tỷ lệ 10 ml cộng 90 ml, 11 ml cộng 99 ml, hoặc 1 ml cộng 99 ml thì lắc bằng tay (thí dụ, 25 lần với khoảng di động là 300 mm trong khoảng 10 giây).

8.3. Thời gian thao tác

Khoảng thời gian từ lúc bắt đầu cân đo phần mẫu thử hoặc từ lúc kết thúc việc chuẩn bị dung dịch pha loãng ban đầu và cho đến khi trộn các dung dịch cấy với môi trường không được quá 15 phút, trừ khi có quy định khác.

8.4. *Cấy mẫu*

Dùng 2 đĩa petri cho sản phẩm dạng lỏng và / hoặc cho mỗi dung dịch mẫu pha loãng được chọn (xem 8.1).

Dùng một pipet cho vào mỗi đĩa 1 ml sản phẩm lỏng, hoặc 1 ml từ dung dịch mẫu pha loãng thích hợp. Chạm đầu mút của pipet vào một điểm khô ráo trong đĩa. Sử dụng một pipet mới cho mỗi độ pha loãng.

8.5. *Rót thạch (môi trường nuôi cấy)*

8.5.1. Rót vào mỗi đĩa petri đã cấy mẫu khoảng 12 ml môi trường VRBL (5.5.1) $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (xem chú thích).

Trộn ngay bằng cách xoay đĩa petri để thu được sự phân bố đồng đều các khuẩn lạc sau khi nuôi. Để yên cho thạch đông lại trên một mặt phẳng nằm ngang, mát.

Chuẩn bị một đĩa đối chứng với 12 ml môi trường để kiểm tra độ vô trùng.

Chú thích - Để kiểm tra nhiệt độ của môi trường xem có đúng $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hay không, nên đặt một nhiệt kế trong dung dịch thạch 1,5% (m/m) được rót vào một cốc chứa riêng biệt với các dung dịch chứa môi trường. Dung dịch kiểm tra nhiệt độ này cần phải đun nóng và làm nguội bằng cách thức giống như đối với mẫu thử.

8.5.2. Sau khi môi trường đã đông lại, rót thêm lên bề mặt đĩa khoảng 4 ml môi trường VRBL (5.5.1) ở nhiệt độ $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ để yên cho đông lại.

8.6. *Nuôi ấm*

Nuôi các đĩa vừa cấy ở tư thế ngược. Không xếp chồng quá 6 đĩa, các đĩa không được để sát nhau và sát các vách và nóc tủ ấm.

Nuôi ở nhiệt độ $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, trong 24 giờ ± 2 giờ.

8.7. *Đọc kết quả*

Sau khi nuôi lấy ra, chỉ giữ lại các đĩa có hơn 10 và ít hơn 150 khuẩn lạc. Đếm các khuẩn lạc đồ thăm, có đường kính ít nhất 0,5 mm, đặc trưng cho nhóm coliform. Tiến hành khẳng định sau thời hạn nuôi theo 8.8, các khuẩn lạc nghi ngờ có thể đợi xem thêm, đặc biệt trong các sản phẩm sữa có chứa các loại đường không phải là lactoza. Tính số khuẩn lạc trong 1 gam hoặc trong 1 mililit, có tính đến kết quả thử nghiệm khẳng định nếu có thực hiện, theo công thức trong 9.2.

8.8. *Thử khẳng định*

Chích cấy 5 khuẩn lạc từ mỗi loại, nếu có thể được vào các ống canh thang lactoza - mật - lục sáng (5.5.2) và nuôi ở nhiệt độ $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ ± 2 giờ. Các khuẩn lạc, từ đó có thể cho thấy sự sinh hơi trong các ống Durham được coi là coliform.

Tính số khuẩn lạc coliform trên từng đĩa từ / hoặc phần trăm khuẩn lạc coliform được khẳng định, hoặc số khuẩn lạc từ mỗi loại có trong đĩa.

9. *Biểu thị kết quả*

9.1. *Giữ lại để tính toán*, các đĩa có nhiều hơn 10 và ít hơn 150 khuẩn lạc.

9.2. *Số coliform có trong 1 mililit (mẫu dạng lỏng) hoặc trong 1 gam* (các sản phẩm khác) theo công thức:

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

Trong đó

ΣC là tổng số khuẩn lạc coliform đếm được theo 8.7 hoặc 8.8;

n_1 là số đĩa Petri được giữ lại theo 8.7 của độ pha loãng đầu tiên được tính;

n_2 là số đĩa được chọn theo 8.7 của độ pha loãng thứ hai;

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng đầu tiên được chọn để tính.

9.3. Để biểu thị số coliform, làm tròn kết quả thu được theo 9.2 đến hai chữ số có nghĩa. Nếu kết quả có số tận cùng là 5, làm tròn bằng cách lấy số chẵn cho chữ số kế liền bên trái.

Chú thích - Nếu có nhiều hơn hai độ pha loãng được sử dụng trong tính toán, công thức trên cần phải sửa đổi để lấy được số đếm của độ pha loãng tiếp theo đó.

Do vậy, đối với trường hợp lấy kết quả từ 3 độ pha loãng, số khuẩn lạc có trong 1 mililit hoặc trong 1 gam tính như sau:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3)d}$$

Trong đó

n_3 là số đĩa trong đợt pha loãng lần 3 có chứa từ 10 đến 300 khuẩn lạc.

9.4. Nếu như số khuẩn lạc đếm được vượt quá 150, thì tính số khuẩn lạc ước lượng trên các đĩa có số khuẩn lạc xấp xỉ 150 và nhân với số nghịch đảo của hệ số pha loãng. Ghi kết quả theo “số Coliform ước lượng trong một mililit hay trong một gam”.

9.6. Kết quả có thể biểu thị theo một số trong khoảng 1,0 và 9,9 nhân với 10^x , trong đó x là lũy thừa tương ứng của 10.

10. Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả phải chỉ ra phương pháp đã sử dụng và kết quả thu được, chỉ rõ phương pháp biểu thị đã dùng. Nó cũng phải đề cập đến tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong phần này của tiêu chuẩn, hoặc tùy ý, cùng với tất cả các tình huống bất thường mà có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Báo cáo kết quả cũng bao gồm mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử.

SỮA VÀ CÁC SẢN PHẨM SỮA

Định lượng Coliform

Phần 2: Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất ở 30°C (MPN)

Milk and milk products – Enumeration of coliforms
Part 2: Most probable number technique at 30°C

TCVN 6262 - 2 : 1997 hoàn toàn tương đương với ISO 5541 - 2 : 1986 (E)

1. Phạm vi và lĩnh vực áp dụng

Phần này của TCVN 6262 : 1997 (ISO 5541) quy định phương pháp định lượng coliform bằng kỹ thuật nuôi cấy trong môi trường lỏng, và tính số có xác suất lớn nhất (MPN) sau khi nuôi ấm ở 30°C.

Phương pháp này có thể áp dụng cho:

- Sữa và các sản phẩm sữa dạng lỏng;
- Sữa bột, bột của dịch tách ra khi sản xuất phomat có đường, bột bơ loãng và lactoza;
- Casein axit, casein lactic và casein rennet;
- Caseinat, bột của dịch tách ra khi sản xuất phomat axit;
- Phomat và phomat chế biến;
- Bơ;
- Sản phẩm sữa đông lạnh (bao gồm cả kem lạnh);
- Custard, món tráng miệng và váng kem.

Phương pháp này thích hợp đối với các mẫu có số lượng Coliform dự tính tương đối thấp (ít hơn 100 coliform trong một gam, hoặc ít hơn 10 coliform trong một mililit).

Chú thích - Đối với các mẫu có số lượng Coliform lớn hơn (trên 100 Coliform trong một gam, hoặc trên 10 Coliform trong một mililit) xem TCVN 6262-1 : 1997(ISO 5541 - 1).

2. Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 707 Sữa và các sản phẩm sữa – Các phương pháp lấy mẫu.

TCVN 4832 Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung về đếm Coliform – Kỹ thuật đếm xác suất lớn nhất ở 30°C.

TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261) Sữa và các sản phẩm sữa - Chuẩn bị mẫu thử và các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh.

3. Định nghĩa

Áp dụng định nghĩa sau đây cho phần này của tiêu chuẩn:

Coliform: Là các vi khuẩn ở nhiệt độ 30°C, tạo thành các khuẩn lạc đặc trưng và có thể lên men lactoza kèm theo sự sinh hơi trong các điều kiện thao tác đã mô tả.

4. Nguyên tắc

- 4.1.** *Nuôi cấy một phần mẫu thử* và/hoặc một lượng từ một loạt mẫu thử pha loãng theo hệ thập phân vào từng dây ba ống môi trường nuôi cấy lỏng chọn lọc đã qui định có chứa ống Durham.
- 4.2.** *Nuôi ấm các ống nghiệm ở 30°C trong 48 giờ.*
- 4.3.** *Lấy từ các ống nghiệm coi là dương tính*, nghĩa là các ống cho thấy có sự sinh hơi trong ống Durham trong canh thang lục sáng mật lactoza, cấy truyền lên bề mặt thạch eosin xanh metylen.
- 4.4.** *Nuôi ấm ở 30°C trong 24 giờ.*
- 4.5.** *Từ các ống nghiệm dương tính đã khẳng định*, nghĩa là các ống nghiệm cho thấy có sự sinh hơi trong ống Durham trong canh thang lục sáng - lactoza - mật, và có tính sinh trưởng đặc trưng trên thạch eosin- xanh metylen, tính số Coliform có trong một mililit, hoặc có trong một gam mẫu thử bằng cách sử dụng bảng (MPN).

5. Chất pha loãng và môi trường**5.1. Nguyên liệu chính**

Để làm tăng độ tái lập của kết quả, nên sử dụng các thành phần chính khô, hoặc các môi trường hoàn chỉnh khô để chuẩn bị các chất pha loãng và các môi trường nuôi cấy. Cần tuân thủ nghiêm ngặt các hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các hoá phẩm sử dụng phải đạt chất lượng phân tích.

Nước sử dụng phải là nước được cất bằng dụng cụ thủy tinh hoặc nước đã khử ion. Nước này không được chứa các chất có thể ức chế sự sinh trưởng của các vi sinh vật trong các điều kiện thử đã nêu. Điều này phải được kiểm tra định kỳ, đặc biệt khi sử dụng nước khử ion.

Có thể sử dụng các dung dịch natri hidroxit và axit clohidric (khoảng 0,1 mol/l) để điều chỉnh pH của chất pha loãng và môi trường.

5.2. Chất pha loãng dùng cho mục đích chung

Chất pha loãng dùng cho mục đích chung

5.2.1. Dung dịch pepton/muối

Chú thích - Dung dịch pepton/muối là loại chất pha loãng do tổ chức ISO chọn dùng cho mục đích chung.

Thành phần

Pepton	1,0 g
Natri clorua (NaCl)	8,5 g
Nước	1000 ml
Chuẩn bị.	

Hoà tan các thành phần trong nước, đun nóng nếu cần. Điều chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,0 \pm 0,1$, ở 25°C.

5.2.2. Dung dịch Ringer nồng độ một phần tư

Thành phần

Natri clorua (NaCl)	2,25 g .
Kali clorua (KCL)	0,105 g
Canxi clorua (CaCl ₂)	0,06 g
Natri hidro cacbonat (NaHCO ₃)	0,05 g

Nước 1000 ml

Chuẩn bị

Hoà tan các muối trong nước. Điều chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $6,9 \pm 0,1$, ở 25°C .

5.2.3. Dung dịch pepton

Thành phần

Pepton 1,0 g
Nước 1000 ml

Chuẩn bị

Hoà tan pepton trong nước. Điều chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng pH là $7,0 \pm 0,1$, ở 25°C .

5.2.4. Dung dịch đậm photphát

Thành phần

Kali dihidro photphát (KH_2PO_4) 42,5 g
Nước 1000 ml

Chuẩn bị

Hoà tan muối trong 500 ml nước. Điều chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng pH là $7,2 \pm 0,1$, ở 25°C . Pha loãng tới 1000 ml. Bảo quản dung dịch gốc này từ 0°C đến 5°C .

Thêm 1,0 ml dung dịch này vào 1000 ml nước.

5.3. *Chất pha loãng dùng cho các mục đích riêng biệt*

5.3.1. Dung dịch natri xitrat (dùng đối với trường hợp phomát, phomát chế biến và sữa sấy màng).

Thành phần

Trinatri xitrat ngậm 2 phân tử nước ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 20 g
Nước 1 000 ml.

Chuẩn bị

Hoà tan muối trong nước bằng cách đun nóng từ 45°C đến 50°C . Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,5 \pm 0,1$, ở 25°C .

5.3.2. Dung dịch dikali hidrophotphat (dùng đối với trường hợp phomát, phomát chế biến, casein, casein axit, bột casein lactic, casein rennet, caseinat, bột của dịch tách ra khi sản xuất phomát axit và sữa sấy màng).

Thành phần

Dikali hidro photphat (K_2HPO_4) 20 g
Nước 1000 ml

Chuẩn bị

Hoà tan muối trong nước bằng cách đun nóng từ 45°C đến 50°C . Điều chỉnh pH. Đối với dung dịch pha loãng ban đầu của casein axit và casein lactic, sau khi khử trùng pH phải là $8,4 \pm 0,1$, ở 25°C . Còn đối với các caseinat, phomát, phomát chế biến, bột của dịch tách ra khi sản xuất phomát axit và sữa sấy màng, sau khi khử trùng pH phải là $7,5 \pm 0,1$, ở 25°C .

5.4. *Phân phối, khử trùng và bảo quản chất pha loãng*

Phân phối chất pha loãng (5.2 hoặc 5.3) dùng cho độ pha loãng ban đầu vào các bình hoặc các lọ (6.4). Phân phối chất pha loãng dùng cho các độ pha loãng tiếp theo (5.2) vào các ống

nghiệm hoặc các lọ nhỏ (6.6). Lượng được phân phối sau khi khử trùng chứa trong mỗi bình hoặc lọ (6.4) phải là 90ml chất pha loãng hoặc một bội số của 90 ml, và mỗi ống nghiệm hoặc lọ nhỏ (6.6) phải chứa 9,0 ml chất pha loãng hoặc một bội số của 9,0 ml (hoặc các lượng khác tùy theo yêu cầu). Đậy nắp các ống nghiệm, bình hoặc các lọ này.

Khử trùng bằng hấp áp lực ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút (đối với các thể tích lớn hơn có thể phải hấp lâu hơn). Nếu chất pha loãng không sử dụng ngay, bảo quản ở chỗ tối, từ 0°C đến 5°C , nhưng không quá 1 tháng dưới các điều kiện không làm thay đổi thể tích hoặc thành phần của chúng.

5.5. Môi trường nuôi cấy

5.5.1. Canh thang lục sáng lactoza mật, môi trường lỏng chọn lọc

Thành phần

Pepton	10 g
Lactoza ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$)	10 g
Mật bò khô	20 g
Xanh lục sáng	0,0133 g
Nước	1000 ml

Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước.

Nếu cần, điều chỉnh pH để sau khi khử trùng pH phải là $7,2 \pm 0,1$, ở 25°C .

Phân phối môi trường theo từng lượng 10 ml vào các ống nghiệm (6.7) có chứa ống Durham (6.8).

Khử trùng bằng hấp áp lực ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút.

Ống Durham không được chứa bọt không khí sau khi khử trùng.

5.5.2. Canh thang nồng độ kép

Tiến hành theo qui định trong 5.5.1, nhưng chỉ sử dụng một nửa lượng nước và phân phối vào các ống nghiệm 20 mm x 200 mm không chứa ống Durham.

5.5.3. Thạch eosin xanh metylen, môi trường khẳng định.

Thành phần

Pepton	10 g
Lactoza ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$)	10 g
Dikali hidro photphát	2 g
Eosin Y	0,4 g
Xanh metylen	0,065 g
Thạch	12 g đến 18 g (theo hướng dẫn của nhà sản xuất)
Nước	1000 ml

Chuẩn bị

Hoà các thành phần rắn vào nước. Nếu cần, chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $6,8 \pm 0,2$, ở 25°C . Đun tới sôi để hoà tan hoàn toàn. Phân phối môi trường thành các lượng từ 100 ml đến 150 ml vào các bình (6.5). Khử trùng bằng hấp áp lực ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút. Để nguội tới 60°C , lắc môi trường để oxi hoá xanh metylen (nghĩa là để khôi phục lại màu xanh của nó) và để các chất kết tủa trở thành huyền phù, đây là một phần quan trọng của môi trường.

Chuẩn bị các đĩa chứa từ 10 ml đến 15 ml môi trường để dùng trong 8.6.

6. Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Chú thích - Có thể dùng các dụng cụ sử dụng một lần để thay cho các dụng cụ thủy tinh có thể sử dụng nhiều lần, nếu như nó phù hợp với các yêu cầu qui định. Dụng cụ thủy tinh tái sử dụng phải có độ bền tốt khi khử trùng lặp lại và phải trở về mặt hoá học.

Sử dụng các thiết bị thí nghiệm vi sinh thông thường và đặc biệt là:

6.1. Thiết bị để khử trùng khô (tủ sấy) hoặc thiết bị để khử trùng ướt (nồi hấp áp lực) (nồi hấp có thể dùng riêng rẽ hoặc dùng như một phần của 1 thiết bị dùng để chuẩn bị và phân phối môi trường). Mọi dụng cụ tiếp xúc với chất pha loãng, mẫu thử, hoặc các dung dịch pha loãng, ngoài các dụng cụ đã khử trùng sẵn, (các túi bằng chất dẻo, pipet bằng chất dẻo...) đều phải được khử trùng bằng một trong các phương pháp sau:

- Giữ trong tủ sấy từ 170°C đến 175°C không ít hơn 1 giờ;
- Giữ trong nồi hấp áp lực ở 121°C ± 1°C không ít hơn 20 phút.

6.2. Thiết bị nghiền - trộn

Có thể sử dụng một trong các thiết bị sau đây:

- Máy trộn quay, có tần số quay từ 8.000 đến 45.000 vòng trên phút, có cốc đựng mẫu bằng thủy tinh hoặc bằng kim loại gắn với nắp, chịu được các điều kiện khử trùng.
- Máy trộn kiểu nhu động, có các túi bằng chất dẻo vô trùng,
- Cối và chày.

Chú thích - Các cốc đựng mẫu, túi bằng chất dẻo hoặc bộ cối chày phải có đủ dung tích để trộn mẫu với lượng chất pha loãng thích hợp. Nói chung, thể tích của vật đựng phải gấp đôi thể tích của mẫu thử cộng với chất pha loãng.

6.3. Máy khuấy, có khả năng khuấy - trộn 1 ml hoặc 2 ml mẫu thử (trong trường hợp mẫu dạng lỏng), hoặc các dung dịch pha loãng thập phân với 9 ml hoặc 18 ml chất pha loãng trong 1 ống nghiệm có kích thước thích hợp, để thu được dịch huyền phù đồng nhất, và có nguyên tắc vận hành dựa trên chuyển động quay lệch tâm lượng chứa trong ống nghiệm (máy trộn Vortex).

6.4. Bình hoặc lọ, có đủ dung tích để chứa 90 ml chất pha loãng dùng để tạo huyền phù gốc, hoặc các bội số của 90 ml, và còn có khoảng trống để trộn.

6.5. Bình, có dung tích từ 150 ml đến 250 ml, để chứa thạch eosin - xanh metylen (5.5.3).

6.6. Ống nghiệm, bình hoặc lọ nhỏ, có đủ dung tích để chứa 10 ml mẫu thử (hoặc bội số của 10 ml) (khi mẫu thử dạng lỏng) hoặc dung dịch pha loãng ban đầu (trong các trường hợp khác) hoặc các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo, và còn có khoảng trống phía trên để trộn.

6.7. Ống nghiệm, dung tích 20 ml, để chứa canh thang lục sáng mật lactoza (5.5.1).

6.8. Ống Durham có kích thước phù hợp với các ống nghiệm (6.7).

6.9. Pipet (được nhét nút bông ở đầu), dung tích danh định là 1 ml và có lỗ thoát có đường kính từ 2 mm đến 3 mm.

Chú thích - Chỉ sử dụng các pipet có đầu còn nguyên vẹn, tốt nhất là loại có vạch chia rõ để phân biệt dung tích.

6.10. Pipet chia độ (được nhét nút bông ở đầu) có dung tích lớn, thí dụ: 10 ml hoặc 20 ml.

Chú thích - Chỉ sử dụng các pipet có đầu còn nguyên vẹn, tốt nhất là loại có vạch chia rõ để phân biệt dung tích.

6.11. Đĩa Petri bằng thủy tinh hoặc bằng chất dẻo có đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

6.12. Bì thủy tinh có đường kính khoảng 6 mm.

6.13. pH mét, có độ chính xác tới ± 0,1 đơn vị pH, ở 25°C.

- 6.14. *Cân*, có khoảng cân phù hợp và có độ chính xác nằm trong giới hạn 1% khối lượng được cân.
- 6.15. *Nồi cách thuỷ*, có thể duy trì nhiệt độ ở $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 6.16. *Nồi cách thuỷ*, có thể duy trì nhiệt độ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 6.17. *Tủ ấm*, có thể duy trì nhiệt độ $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ở bất kỳ điểm nào trong tủ.
- 6.18. *Que cấy vòng*, bằng hợp kim platin - iridi hoặc niken - crom, đường kính khoảng 3 mm.

7. Lấy mẫu

Xem ISO 707.

8. Cách tiến hành

Chú thích

- 1) Các thao tác mô tả trong các điều từ 8.1 đến 8.5 không được tiến hành trực tiếp dưới ánh sáng mặt trời.
- 2) Luôn luôn phải chú ý đảm bảo vô trùng.

8.1. Chuẩn bị mẫu thử và dung dịch pha loãng ban đầu

Để tránh làm ảnh hưởng các vi sinh vật do thay đổi nhiệt độ đột ngột, nhiệt độ của chất pha loãng trong suốt quá trình thao tác mô tả dưới đây luôn phải bằng nhiệt độ của mẫu thử, trừ khi có qui định khác.

8.1.1. Sữa và các sản phẩm sữa dạng lỏng

Trộn mẫu thử thật kỹ sao cho các vi sinh vật phân bố càng đều càng tốt bằng cách đảo chiều lọ chứa liên tục 25 lần. Cần phải tránh tạo bọt hoặc để bọt tan hết. Khoảng thời gian từ khi trộn đến khi lấy phần mẫu thử không được quá 3 phút.

Dùng pipet lấy 1 ml mẫu thử và cho vào 9 ml chất pha loãng (5.2) (hoặc lấy 10 ml mẫu thử cho vào 90 ml chất pha loãng, hoặc lấy 11 ml mẫu thử cho vào 99 ml chất pha loãng). Lắc đều dung dịch pha loãng ban đầu này (thí dụ, lắc 25 lần với khoảng di động là 300 mm, trong khoảng 10 giây). Như vậy thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

8.1.2. Sữa bột, bột của dịch tách ra khi sản xuất phomat có đường, bột bơ loãng và lactoza.

Trộn kỹ lượng chứa trong lọ kín bằng cách lắc và đảo chiều liên tục. Nếu mẫu thử đựng trong lọ kín còn nguyên, quá đầy nên khó lắc trộn, thì chuyển sang lọ chứa to hơn. Trộn đều. Mở nắp, dùng thìa xúc lấy phần mẫu thử theo yêu cầu và tiến hành theo chỉ dẫn dưới đây. Đóng nắp hộp lại ngay.

Hâm nóng lọ chứa 90 ml chất pha loãng thích hợp tới $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong nồi cách thuỷ (6.15).

Cân 10 g mẫu thử cho vào bình thuỷ tinh (thí dụ như cốc có mỏ) và rót dần bột vào lọ pha loãng có chứa chất pha loãng thích hợp (5.2 hoặc, nếu cần đối với sữa sấy màng dùng chất pha loãng 5.3.1 hoặc 5.3.2 ở pH $7,5 \pm 0,1$). Cách khác, cân 10 g mẫu thử cho trực tiếp vào lọ chứa chất pha loãng.

Để hoà tan, xoay tròn từ từ lọ cho bột thấm ướt và sau đó lắc lọ 25 lần với khoảng di động là 300 mm trong khoảng 10 giây. Có thể dùng máy trộn kiểu nhu động (6.2.b) để thay cho việc lắc.

Đặt lọ mẫu vào nồi cách thuỷ trong 5 phút và thỉnh thoảng lắc. Như vậy, thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

Chú thích - Để hoà tan được tốt hơn, đặc biệt đối với sữa sấy màng nên sử dụng bình thuỷ tinh (6.12). Nếu sử dụng thì phải cho vào lọ trước khi khử trùng.

8.1.3. Phomat và phomat chế biến

Cân 10 g phomat hoặc phomat chế biến trong 1 đĩa. Chuyển vào cốc đựng của máy trộn quay (6.2.a), hoặc túi đựng của máy trộn kiểu nhu động (6.2.b) hoặc cho vào cối nghiền (6.2.c).

Khi dùng máy trộn quay hoặc máy trộn kiểu nhu động, cho thêm 90 ml chất pha loãng (5.2, 5.3.1, hoặc 5.3.2, ở pH $7,5 \pm 0,1$). Trộn cho đến khi phomat tan (từ 1 phút đến 3 phút). Tốt nhất là phải đảm bảo nhiệt độ của quá trình tan không vượt quá 40°C và trong mọi trường hợp không để nhiệt độ vượt quá 45°C . Để cho bột tan hết. Nếu dùng cối để nghiền thì cho thêm lượng chất pha loãng tối thiểu và trộn bằng chày để thu được bột nhão đồng nhất không vón cục. Thêm chất pha loãng còn lại của tổng 90ml chất pha loãng. Như vậy thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

8.1.4. Casein axit, casein lactic và casein rennet

Cân 10 g sản phẩm trong đĩa. Chuyển vào lọ pha loãng có chứa bi thủy tinh (6.12.) và 90 ml chất pha loãng dikali hidrophotphat (5.3.2) ở pH 8,4 đối với trường hợp axit casein, casein lactic.

Để yên 15 phút và sau đó tăng nhiệt độ lên $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong nồi cách thủy (6.16).

Giữ lọ ở 37°C thêm 15 phút nữa và lắc mạnh từng đợt. Như vậy thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

Chú thích - không nên sử dụng máy trộn quay (6.2.a) hoặc máy trộn kiểu nhu động (6.2.b) vì sẽ tạo nhiều bọt.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

8.1.5. Caseinat và bột của dịch tách ra khi sản xuất phomat axit

Cân 10 g sản phẩm vào 1 đĩa. Rót thật chậm lên bề mặt của 90 ml chất pha loãng dikali hidrophotphat (5.3.2) ở pH $7,5 \pm 0,1$ trong lọ pha loãng, sau lắc hỗn hợp sau mỗi lần rót.

Cách khác, cho sản phẩm khô vào một thể tích tối thiểu chất pha loãng và khuấy bằng dũa thủy tinh để thu được khối bột nhão đồng nhất không vón cục. Thêm phần chất pha loãng còn lại của tổng 90 ml chất pha loãng.

Để yên 15 phút và sau đó tăng nhiệt độ lên $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong nồi cách thủy (6.16). Giữ lọ mẫu pha loãng ở 37°C thêm 15 phút nữa. Trộn kỹ hỗn hợp bằng máy trộn quay (6.2.a), hoặc máy trộn kiểu nhu động (6.2.b). Để cho bột tan hết trước khi tiếp tục tiến hành. Như vậy thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

8.1.6. Bơ

Cho mẫu thử vào vật chứa đặt trong nồi cách thủy ở $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (6.15). Khuấy cho chóng tan chảy và để đến khi mẫu thử vừa tan hết. Lắc đều và dùng pipet đã sấy nóng đến 45°C để lấy 10 ml cho vào 1 bình có chứa 90ml chất pha loãng (5.2). Trước mỗi lần lấy phải lắc kỹ. Có thể dùng máy trộn kiểu nhu động (6.2.b) để trộn. Như vậy thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

Cách khác, chỉ sử dụng pha nước để pha loãng như sau:

Lấy phần mẫu thử 50 g (có chứa khoảng 8 ml nước) và thêm 42 ml chất pha loãng (5.2.3) đã được hâm nóng đến 45°C . Đặt vật chứa mẫu vào nồi cách thủy ở $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (6.15) cho đến khi bơ tan hết. Lắc kỹ và để cho tách pha không quá 15 phút. Dùng pipet hút từ lớp dưới đáy; 1 ml này tương đương với 1 g bơ.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 3.2.

8.1.7. Sản phẩm sữa đông lạnh (bao gồm cả kem lạnh)

Tiến hành như trường hợp đối với bơ (8.1.6) (cách thứ nhất) nhưng dùng nồi cách thủy ở nhiệt độ không vượt quá 37°C (6.16). Nhiệt độ của mẫu thử không được vượt quá 37°C. Như vậy thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

8.1.8. Custard, món tráng miệng, sữa lên men và văng kem

Cân 10 g sản phẩm cho vào 1 bình (6.4) có chứa bi thủy tinh (6.12).

Đối với custard, món tráng miệng và văng kem ngọt thêm 90 ml chất pha loãng (5.2) và lắc cho tan đều. Đối với sữa lên men và văng kem chua sử dụng chất pha loãng 5.2 hoặc 5.2.3 ở pH 7,5 $\pm$ 0,1. Có thể sử dụng máy trộn kiểu nhu động (6.2.b). Như vậy thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

8.2. Dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo

Dùng 1 pipet sạch lấy 1 ml dung dịch pha loãng ban đầu cho vào 1 ống nghiệm khác chứa 9 ml chất pha loãng vô trùng, không để pipet tiếp xúc với chất pha loãng. Mỗi lần pha loãng phải sử dụng một pipet mới.

Cách khác, lấy 10 ml dung dịch pha loãng ban đầu cho vào lọ chứa 90 ml chất pha loãng vô trùng, hoặc 11 ml dung dịch pha loãng ban đầu cho vào lọ chứa 99 ml chất pha loãng vô trùng. Trong cách tiến hành thông thường, nếu cần dung dịch pha loãng 10^{-3} , lấy 1 ml dung dịch pha loãng ban đầu cho vào 99 ml chất pha loãng vô trùng.

Trộn kỹ, hoặc bằng cách dùng pipet sạch hút thả 10 lần, hoặc dùng máy trộn cơ học (6.3) trong khoảng từ 5 giây đến 10 giây để thu được dung dịch pha loãng 10^{-2} . Chọn tần số quay sao cho chất lỏng khi xoáy dâng cao từ 20 mm đến 30 mm trên thành bình chứa.

Nếu thấy cần, lặp lại các thao tác này sử dụng dung dịch pha loãng 10^{-2} và các dung dịch pha loãng tiếp theo để nhận được dung dịch pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} , v.v...

Khi lấy tỷ lệ 10 ml cộng 90 ml, 11 ml cộng 99 ml hoặc 1 ml cộng 99 ml thì lắc bằng tay (thí dụ, lắc 25 lần với khoảng di động là 300 mm trong khoảng 10 giây).

Pha đủ số lượng các dung dịch pha loãng để đảm bảo rằng tất cả các ống nghiệm tương ứng với độ pha loãng cuối cùng cho kết quả âm tính.

8.3. Thời gian thao tác

Khoảng thời gian từ lúc bắt đầu cân đo phần mẫu thử hoặc từ lúc kết thúc việc chuẩn bị dung dịch pha loãng ban đầu và cho đến khi trộn các dung dịch cấy với môi trường không được quá 15 phút, trừ khi có qui định khác.

8.4. Cấy mẫu

8.4.1. Lấy ba ống nghiệm đựng canh thang nồng độ kép (5.5.2) và dùng pipet cho vào mỗi ống 10 ml mẫu thử dạng lỏng, hoặc 10 ml dung dịch pha loãng ban đầu.

8.4.2. Lấy ba ống nghiệm đựng canh thang nồng độ đơn (5.5.1) và dùng pipet cho vào mỗi ống 1 ml mẫu thử dạng lỏng, hoặc 1 ml dung dịch pha loãng ban đầu.

8.4.3. Đối với mỗi một dung dịch pha loãng tiếp theo (10^{-1} hoặc 10^{-2} , tùy theo từng trường hợp) lấy ba ống nghiệm canh thang nồng độ đơn (5.5.1). Cho vào mỗi ống 1 ml dung dịch pha loãng thích hợp.

Đối với mỗi độ pha loãng dùng một pipet mới. Trộn cẩn thận chất nuôi cấy với môi trường.

8.5. Nuôi cấy

8.5.1. Nuôi ẩm các ống nghiệm canh thang nồng độ kép (8.4.1) ở $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

8.5.2. Nuôi ẩm các ống nghiệm canh thang nồng độ đơn (8.4.2 và 8.4.3) ở $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

8.6. *Cấy truyền từ các ống nghiệm canh thang nồng độ kép đã nuôi ẩm.*

Từ mỗi ống nghiệm canh thang nồng độ kép (8.4.1) đã nuôi ẩm dùng que cấy vòng (6.18) cấy vào 1 ống nghiệm canh thang nồng độ đơn (5.5.1). Nuôi ẩm ở $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

8.7. *Thử khẳng định*

8.7.1. Từ mỗi ống nghiệm nuôi ẩm (8.5.2 và 8.6) cho thấy có sự sinh hơi trong ống Durham, cấy một vòng dây lên thạch eosin xanh metylen (5.5.3). Nuôi ẩm ở $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

8.7.2. Các khuẩn lạc mọc có màu đỏ / hồng, ánh kim và đục được coi là đặc trưng.

Nếu cần khẳng định thêm nữa, nuôi cấy các khuẩn lạc vào ống nghiệm chứa canh thang nồng độ đơn (5.5.1) và kiểm tra sự sinh hơi sau khi nuôi ẩm (8.5.2).

8.7.3. Ghi lại số ống khẳng định dương tính đối với mỗi độ pha loãng.

9. *Biểu thị kết quả*

9.1. *Lựa chọn các độ pha loãng*

Đối với mỗi mẫu cần kiểm tra, chọn ba độ pha loãng liên tiếp phù hợp với một trong ba qui luật sau đây:

a) Khi ít nhất có một dung dịch pha loãng cho ba ống khẳng định dương tính.

Chọn độ pha loãng cao nhất (có nồng độ mẫu thử thấp nhất) cho kết quả ba ống khẳng định dương tính, với hai độ pha loãng tiếp theo (nghĩa là có nồng độ mẫu thử của dung dịch pha loãng 10^{-1} và 10^{-2} của dung dịch pha loãng thứ nhất đã chọn).

Xem thêm qui luật c).

Nếu không có đủ các dung dịch pha loãng tiếp theo từ dung dịch pha loãng nhất cho kết quả ba ống khẳng định dương tính, thì chọn ba dung dịch pha loãng nhất trong cả loạt ống thử đó (nghĩa là các dung dịch có nồng độ mẫu thử thấp nhất trong dãy) để thay thế.

b) Khi không có dung dịch pha loãng nào cho kết quả ba ống khẳng định dương tính

Nếu không áp dụng được qui luật a), chọn ba dung dịch pha loãng nhất trong dãy thử (nghĩa là các dung dịch có nồng độ mẫu thử thấp nhất trong dãy)

Xem thêm qui luật c).

c) Trường hợp đặc biệt

Trong tất cả các trường hợp, khi có nhiều hơn một trong ba độ pha loãng được chọn theo qui luật a) và b) không cho các ống khẳng định dương tính, thì chọn ra từ các độ pha loãng ở trên độ pha loãng thấp nhất không cho các ống khẳng định dương tính (nghĩa là có nồng độ mẫu thử cao nhất) và hai độ pha loãng thấp hơn tiếp liền theo trong cùng dãy (nghĩa là có nồng độ của mẫu thử cao hơn 10 lần và 100 lần của độ pha loãng thứ nhất được chọn) trừ khi các ống khẳng định dương tính chỉ được tìm thấy ở độ pha loãng thứ nhất chuẩn bị từ mẫu thử. Trong trường hợp cuối cùng này, cần thiết phải chọn ba độ pha loãng thứ nhất để tính số có xác suất lớn nhất (MPN) thậm chí ngay cả khi dãy thử này có hai độ pha loãng không cho ống khẳng định dương tính nào.

Xem các thí dụ trong bảng 1.

Bảng 1 – Thí dụ về cách chọn các độ pha loãng

Thí dụ	Số ống kháng định dương tính ở mỗi nồng độ mẫu thử ¹⁾				MPN
	10 g hoặc 10 ml	1 g hoặc 1 ml	0,1 g hoặc 0,1 ml	0,01 g hoặc 0,01 ml	
A	3	1	1	0	7 trên 10 g hoặc 10 ml
B	2	1	0	0	1,5 trên 10g hoặc 10 ml hoặc 15 trên 100 g hoặc 100 ml
C		3	2	0	9 trên 1 g hoặc 1 ml
D		3	2	2	21 trên 1 g hoặc 1 ml
E		3	0	1	4 trên 1 g hoặc 1 ml

1) Các độ pha loãng lựa chọn có gạch ở dưới

9.2. Xác định chỉ số MPN

Xác định chỉ số MPN của coliform từ số ống nghiệm kháng định dương tính đối với mỗi độ pha loãng lựa chọn, theo bảng 2.

9.3. Tính số có xác suất lớn nhất (MPN)

Nhân chỉ số MPN (9.2) với tỷ lệ nghịch của độ pha loãng thấp nhất được chọn (nghĩa là có nồng độ mẫu thử cao nhất) cho ra số coliform có trong 1 mililit hoặc trong 1 gam.

Khi độ pha loãng thấp nhất được chọn tương ứng với các ống đã cấy với môi trường nồng độ kép (cấy vào 10 ml) thì trước hết chia chỉ số MPN cho 10.

Kết quả có thể biểu thị theo một số trong khoảng 1,0 và 9,9 nhân với 10^x , trong đó x là lũy thừa tương ứng của 10

9.4. Độ chính xác

Thực nghiệm cho thấy rằng trong kết quả của kỹ thuật MPN có thể xảy ra sai số lớn. Do đó, phải thận trọng khi sử dụng các kết quả thu được bằng phương pháp này.

Các giới hạn tin cậy được đưa ra trong bảng 2.

10. Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả phải chỉ ra phương pháp đã sử dụng và các kết quả thu được, chỉ rõ phương pháp biểu thị đã dùng. Nó cũng phải đề cập đến tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong phần này của tiêu chuẩn, hoặc được xem là tùy ý cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Báo cáo kết quả cũng bao gồm các thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử.

Bảng 2 – Chỉ số MPN và các giới hạn tin cậy

Số lượng các ống khẳng định dương tính của ba độ pha loãng được chọn			Chỉ số MPN	Các giới hạn tin cậy			
Thứ nhất	Thứ hai	Thứ ba		>95%	>95%	>99%	>99%
0	0	0	<0,30	0,00	0,94	0,00	1,40
0	0	1	0,30	0,01	0,95	0,00	1,40
0	1	0	0,30	0,01	1,00	0,00	1,60
0	1	1	0,61	0,12	1,70	0,05	2,50
0	2	0	0,62	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0	0,94	0,35	3,50	0,18	4,60
1	0	0	0,36	0,02	1,70	0,01	2,50
1	0	1	0,72	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	2	1,1	0,4	3,5	0,2	4,6
1	1	0	0,74	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,1	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	0	1,1	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	1	1,5	0,5	3,8	0,2	5,2
1	3	0	1,6	0,5	3,8	0,2	5,2
2	0	0	0,92	0,15	3,5	0,07	4,60
2	0	1	1,4	0,4	3,5	0,2	4,60
2	0	2	2,0	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	0	1,5	0,4	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	2	2,7	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	0	2,1	0,5	4,0	0,2	5,6
2	2	1	2,8	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	2	3,5	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	0	2,9	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	1	3,6	0,9	9,4	0,5	14,2
3	0	0	2,3	0,5	9,4	0,3	14,2
3	0	1	3,8	0,9	10,4	0,5	15,7
3	0	2	6,4	1,6	18,1	1,0	25,0
3	1	0	4,3	0,9	18,1	0,5	25,0
3	1	1	7,5	1,7	19,9	1,1	27,0
3	1	2	12	3	36	2	44
3	1	3	16	3	38	2	52
3	2	0	9,3	1,8	36,0	1,2	43,0
3	2	1	15	3	38	2	52
3	2	2	21	3	40	2	56
3	2	3	29	9	99	5	152
3	3	0	24	4	99	3	152
3	3	1	46	9	198	5	283
3	3	2	110	20	400	10	570
3	3	3	>110				

1) Xem các bảng MPN của Man đã hiệu chỉnh. J.C.Eur.J.Appl. Biotechnol.17, 1983, 301 – 305.

SỮA VÀ CÁC SẢN PHẨM SỮA

Định lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc từ các vi sinh vật - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C

*Milk and milk products - Enumeration of colony-forming units of micro-organisms -
Colony-count technique at 30°C*

TCVN 6264 : 1997 hoàn toàn tương đương với ISO 6610 : 1992 (E);

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) từ các vi sinh vật trong sữa và các sản phẩm sữa bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C.

Phương pháp này có thể áp dụng cho:

- Sữa và các sản phẩm sữa dạng lỏng;
- Sữa bột, bột của dịch tách ra khi sản xuất phomat có đường, bột bơ loãng và lactoza;
- Casein axit, casein lactic, casein rennet;
- Caseinat, bột của dịch sữa axit;
- Phomat chế biến;
- Bơ.
- Sản phẩm sữa đông lạnh (kể cả kem lạnh thực phẩm);
- Custard, món tráng miệng và váng kem.

2. Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 7218 : 1985 Vi sinh vật học - Hướng dẫn chung về kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989) Sữa và các sản phẩm sữa - Chuẩn bị mẫu thử và các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh.

ISO 707 : 1985 Sữa và các sản phẩm sữa - Các phương pháp lấy mẫu.

TCVN 4550 : 1988 (ISO 5725) Độ chính xác của các phương pháp thử nghiệm - Xác định độ lặp lại và độ tái lập cho phương pháp thử chuẩn bằng các phương pháp thử của liên phòng thí nghiệm.

3. Định nghĩa

Áp dụng định nghĩa sau đây trong tiêu chuẩn này:

- 3.1. **Vi sinh vật** - Các vi khuẩn, nấm men, nấm mốc dưới các điều kiện qui định trong tiêu chuẩn này tạo thành các khuẩn lạc có thể đếm được.

4. Nguyên tắc

4.1. Chuẩn bị các đĩa nuôi cấy sử dụng môi trường nuôi cấy chọn lọc và một lượng mẫu thử xác định nếu như sản phẩm ban đầu là dạng lỏng, hoặc để dụng huyền phù ban đầu khi sản phẩm dạng khác.

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

4.2. Nuôi ấm các đĩa ở 30°C, trong 72 giờ trong môi trường có không khí.

4.3. Tính số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) từ các vi sinh vật trong 1 gam, hoặc trong 1 mililit sản phẩm từ số khuẩn lạc thu được trên các đĩa đã chọn ở các độ pha loãng sao cho có được kết quả thoả đáng.

5. Chất pha loãng và môi trường nuôi cấy

5.1. Khái quát

Hướng dẫn chung, xem ISO 7218.

5.2. Nguyên liệu chính

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989).

5.3. Chất pha loãng dùng cho mục đích chung

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989).

5.4. Chất pha loãng dùng cho các mục đích riêng biệt

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989).

5.5. Phân phối, khử trùng và bảo quản chất pha loãng

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989).

5.6. Môi trường nuôi cấy

5.6.1. Thành phần

Tripton	5,0 g
Cao men	2,5 g
Glucosa ngậm 1 phân tử nước ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	1,0 g
Sữa bột gầy ¹⁾	1,0 g
Thạch	10 g đến 15 g ²⁾
Nước	1000 ml

¹⁾ Sữa bột gầy không được chứa các chất ức chế. Điều này phải được kiểm tra bằng thử so sánh dùng sữa bột gầy đã biết trước là không chứa các chất này.

²⁾ Tùy theo độ đông của thạch.

5.6.2. Chuẩn bị

5.6.2.1. Chuẩn bị từ môi trường hoàn chỉnh khô thương phẩm

Tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất, nhưng trong mọi trường hợp, phải cho thêm sữa bột gầy, ngay cả khi nhà sản xuất coi việc thêm như vậy là không cần thiết.

Nếu cần, chỉnh pH để sau khi khử trùng, pH là 7,0, ở 25°C.

5.6.2.2. Chuẩn bị từ các thành phần chính khô.

Hoà tan và phân tán trong nước theo trình tự sau: Cao men, tripton, glucôza và cuối cùng là sữa bột gầy. Nước được hâm nóng sẽ giúp cho việc hòa tan tốt hơn.

Cho thêm thạch và đun sôi, khuấy đều cho đến khi thạch tan hoàn toàn, hoặc đun nóng trong nồi hơi nước trong khoảng 30 phút. Nếu cần, dùng giấy lọc để lọc.

Nếu cần, chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng pH là 7,0, ở 25°C.

5.6.2.3. Phân phối, khử trùng và bảo quản

Phân phối môi trường (5.6) vào ống nghiệm (6.9) lượng từ 12 ml đến 15 ml trong mỗi ống, hoặc cho vào bình hoặc lọ (6.9) với lượng từ 100 ml đến 150 ml.

Khử trùng bằng nồi hấp (6.1) ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút. Nếu môi trường dùng ngay thì làm nguội đến 45°C trong nồi cách thủy (6.5). Nếu không dùng ngay, trước khi bắt đầu tiến hành thử nghiệm vi sinh, để tránh mọi sự chậm trễ khi rót môi trường, làm tan chảy hoàn toàn môi trường trong nồi cách thủy nóng (6.6), sau đó làm nguội đến 45°C trong nồi cách thủy (6.5).

Chú thích

- 1) Để kiểm tra được nhiệt độ của thạch, đặt một nhiệt kế vào một lượng dung dịch 15 g/l thạch được đựng trong bình riêng biệt giống hệt loại bình để đựng môi trường. Dung dịch kiểm tra nhiệt độ này phải được tiến hành các thao tác tương tự về đun nóng và làm nguội, giống như đối với môi trường nuôi cấy.
- 2) Không được để môi trường trong nồi cách thủy quá 3 giờ.

6. Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Chú ý - Phải khử trùng tất cả các dụng cụ tiếp xúc với mẫu thử, với chất pha loãng, với dung dịch pha loãng, hoặc với môi trường nuôi cấy phù hợp với TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 :1989) (6.1).

Chú thích 3 - Có thể dùng các dụng cụ sử dụng một lần để thay cho các dụng cụ thủy tinh có thể sử dụng nhiều lần, nếu như nó phù hợp với các yêu cầu qui định.

Sử dụng các thiết bị thông thường của phòng thí nghiệm vi sinh, các thiết bị cần thiết để xử lý mẫu thử và các dung dịch pha loãng theo qui định của TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 :1989) và đặc biệt là:

- 6.1. **Thiết bị để khử trùng khô (lò sấy) hoặc khử trùng ướt (nồi hấp)**, xem ISO 7218.
- 6.2. **Tủ ấm**, có khả năng hoạt động ở $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 6.3. **Đĩa Petri**, làm bằng thủy tinh hoặc chất dẻo, có đường kính từ 90 mm đến 100 mm.
- 6.4. **Pipet chia độ**, được nhét nút bông, đã hiệu chỉnh dung tích 1 ml $\pm 0,02$ ml, hoặc 10 ml $\pm 0,2$ ml.
- 6.5. **Nồi cách thủy**, có khả năng hoạt động ở $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 6.6. **Nồi cách thủy**, có khả năng hoạt động từ 100°C trở lên.
- 6.7. **Thiết bị đếm khuẩn lạc**, bao gồm một bộ phận chiếu sáng có nền đen, được gắn với kính lúp có độ khuếch đại 1,5 lần và có một dụng cụ đếm cơ hoặc điện tử.
- 6.8. **pH mét bù nhiệt**, chính xác tới $\pm 0,1$ đơn vị pH, ở 25°C .
- 6.9. **Ống nghiệm có dung tích khoảng 20 ml** (hoặc bình, lọ có dung tích tương tự) và lọ hoặc bình có dung tích từ 150 ml đến 250 ml, dùng để khử trùng và bảo quản môi trường nuôi cấy.

Chú thích 4 - Có thể dùng lọ hoặc bình có nắp xoáy, bằng kim loại không độc.

7. Lấy mẫu

Lấy mẫu theo ISO 707.

8. Cách tiến hành

Chú thích 5 - Để tăng độ chính xác của phương pháp, việc chuẩn bị các dung dịch pha loãng phải được chuẩn hóa cẩn thận. Những yếu tố tác động đến độ chính xác là:

- Kiểu loại thiết bị khuấy trộn;
- Thời gian khuấy trộn;
- Chất pha loãng;
- Thời gian để cho các hạt to lắng xuống;
- Thời gian khuấy cho phép khi chuẩn bị các dung dịch loãng theo hệ thập phân.

Chú ý - Phải thực hiện các thao tác vô trùng thông thường. Những thao tác qui định trong 8.1 và 8.2 không được tiến hành dưới ánh nắng mặt trời.

8.1. Chuẩn bị mẫu thử và dung dịch pha loãng ban đầu

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989).

8.2. Dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989).

8.3. Thời gian tiến hành

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989), 8.3.

8.4. Cấy và nuôi cấy

- 8.4.1. Lấy hai đĩa Petri (6.3) vô trùng. Dùng một pipet vô trùng (6.4) cho vào mỗi đĩa 1 ml mẫu thử, nếu là dạng lỏng, hoặc 1 ml chất huyền phù ban đầu nếu là sản phẩm dạng khác.
- 8.4.2. Lấy tiếp hai đĩa Petri vô trùng. Dùng một pipet vô trùng khác cho vào mỗi đĩa 1 ml dung dịch pha loãng 10^{-1} (sản phẩm ở dạng lỏng) hoặc 1 ml dung dịch pha loãng 10^{-2} (sản phẩm ở dạng khác).
- 8.4.3. Nếu cần, lặp lại thao tác này, sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo.
- 8.4.4. Rót vào mỗi đĩa Petri khoảng từ 12 ml đến 15 ml môi trường nuôi cấy (5.6), đã được làm cho tan chảy từ trước và giữ ở 45°C trong nồi cách thủy (6.5).
- 8.4.5. Khuấy trộn thật kỹ chất cấy với môi trường bằng cách xoay đĩa Petri và để cho hỗn hợp đông đặc bằng cách đặt các đĩa Petri này trên một mặt phẳng nằm ngang, mát.
- 8.4.6. Thời gian từ khi chuẩn bị dung dịch pha loãng thứ nhất đến khi trộn chất nuôi cấy với môi trường không được vượt quá 15 phút.
- 8.4.7. Chuẩn bị đủ số đĩa đối chứng để kiểm tra độ vô trùng.
- 8.4.8. Lật ngược các đĩa đã cấy xong và đặt chúng vào tủ ấm (6.2), đặt ở nhiệt độ 30°C trong $72 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$.

Chú thích 6: Để ngăn hiện tượng lan rộng cần phải để phòng như sau:

- Phủ thêm một lớp môi trường nuôi cấy lên trên mặt các đĩa cấy sau khi đã đông đặc, hoặc
- Nhỏ thêm một giọt glyxerol lên giấy lọc ở nắp của đĩa.

- 8.4.9. Không chồng quá 6 đĩa lên nhau. Để các chồng đĩa tách xa hẳn nhau cũng như xa thành và xa nóc tủ ấm.

8.5. Đọc kết quả

- 8.5.1. Đếm số khuẩn lạc trong mỗi đĩa (xem 9.1) sử dụng thiết bị đếm khuẩn lạc (6.7).

Kiểm tra các đĩa dưới ánh sáng dịu. Điều này rất quan trọng vì những chấm khuẩn lạc nhỏ cũng phải được đếm, nhưng điều cơ bản là người kỹ thuật viên phải tránh lẫn lộn các hạt nhỏ không tan hoặc các chất kết tủa trong đĩa với khuẩn lạc nhỏ. Kiểm tra thật cẩn thận các đếm còn nghi ngờ, dùng kính lúp có độ khuếch đại cao hơn nếu thấy cần, để phân biệt được khuẩn lạc với các chất lạ.

8.5.2. Những khuẩn lạc mọc lan rộng được tính là những khuẩn lạc đơn lẻ. Nếu các khuẩn lạc mọc lan rộng nhưng ít hơn 1/4 bề mặt đĩa thì đếm những khuẩn lạc trên phần còn lại của đĩa và tính số lượng tương ứng cho toàn đĩa. Nếu lan rộng hơn 1/4 bề mặt đĩa thì loại bỏ đĩa đó.

9. Biểu thị kết quả

9.1. *Chỉ giữ lại các đĩa có ít nhất là 10 khuẩn lạc, nhiều nhất là 300 khuẩn lạc.*

Tính số vi sinh vật CFU từ các vi sinh vật, N, trong 1 gam hoặc trong 1 mililit sản phẩm, theo công thức:

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

Trong đó

$\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trong tất cả các đĩa được giữ lại;

n_1 là số đĩa của độ pha loãng thứ nhất, có chứa từ 10 đến 300 khuẩn lạc;

n_2 là số đĩa của độ pha loãng thứ hai có chứa từ 10 đến 300 khuẩn lạc;

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất.

Chú thích 7 - Nếu có nhiều hơn hai độ pha loãng có thể đếm được, cho kết quả từ 10 đến 300 khuẩn lạc thì công thức phải được sửa đổi, có tính đến những độ pha loãng tiếp theo đó. Với ba độ pha loãng thì tính theo công thức:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3)d}$$

Trong đó

n_3 là số đĩa của độ pha loãng thứ 3 được giữ lại, có chứa từ 10 đến 300 khuẩn lạc.

Làm tròn số kết quả thu được đến 2 chữ số có nghĩa. Khi số cần làm tròn là 5 mà không có chữ số có nghĩa nào đứng theo sau thì làm tròn số đứng trước chữ số 5 cho thành số chẵn. Thí dụ: 28.500 làm tròn thành 28.000, và 11.500 được làm tròn thành 12.000.

Lấy kết quả là số đơn vị khuẩn lạc CFU của vi sinh vật trong 1 mililit hoặc trong 1 gam sản phẩm, biểu thị bằng một số từ 1,0 đến 9,9 nhân với 10^x , trong đó x là lũy thừa tương ứng của 10.

Thí dụ:

Việc đếm khuẩn lạc vi sinh vật ở 30°C cho kết quả sau (hai đĩa Petri cho mỗi độ pha loãng đã được ủ):

- Độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) được giữ lại, chứa 168 và 215 khuẩn lạc
- Độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) được giữ lại, chứa 14 và 25 khuẩn lạc

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{[2 + (0,1 \times 2)]10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19182$$

Làm tròn kết quả như hướng dẫn trên thu được 19000 hoặc $1,9 \times 10^4$ CFU vi sinh vật trong một gam hoặc trong một mililít sản phẩm.

9.2. Nếu có hai đĩa tương ứng với mẫu thử (sản phẩm lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) có chứa ít hơn 10 khuẩn lạc thì báo cáo kết quả như sau:

- Ít hơn 10 vi sinh vật CFU trong một mililít (sản phẩm lỏng)
- Ít hơn $10 \times 1/d$ vi sinh vật CFU trong một gam (sản phẩm dạng khác), trong đó d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu.

9.3. Nếu tất cả các đĩa đều chứa nhiều hơn 300 khuẩn lạc, thì tính số lượng ước tính từ các đĩa có số khuẩn lạc gần 300 nhất và nhân số này với số nghịch đảo của độ pha loãng cao nhất. Báo cáo kết quả theo "số lượng đơn vị khuẩn lạc vi sinh vật ước tính trong một gam hoặc một mililít sản phẩm".

10. Độ lặp lại

Độ chênh lệch tuyệt đối giữa kết quả thu được từ hai lần thử nghiệm riêng rẽ, khi sử dụng cùng một phương pháp, phân tích trên cùng nguyên liệu, do cùng một người tiến hành trong cùng một phòng thí nghiệm dùng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được vượt quá 30% của kết quả thấp hơn.

Chú thích

8) Nếu các trường hợp không thỏa mãn yêu cầu về độ lặp lại là 5%, hoặc lớn hơn thì cần xem xét nguồn gốc có khả năng gây ra sai lỗi.

9) Định nghĩa về độ lặp lại xem TCVN 4550 : 1988 (ISO 5725).

11. Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả phải chỉ ra phương pháp đã sử dụng, kết quả thử nghiệm thu được và phương pháp biểu thị đã sử dụng. Cũng phải đề cập đến tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả.

Báo cáo kết quả cũng bao gồm tất cả mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử.

SỮA VÀ CÁC SẢN PHẨM SỮA

Định lượng đơn vị khuẩn lạc nấm men và/ hoặc nấm mốc - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 25°C

Milk and milk products - Enumeration of colony-forming units of yeasts and / or moulds - Colony-count technique at 25°C

TCVN 6265 : 1997 hoàn toàn tương đương với ISO 6611 : 1992 (E);

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) từ nấm men và/hoặc nấm mốc nhìn thấy trong sữa và sản phẩm sữa bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 25°C.

Phương pháp này có thể áp dụng cho:

- Sữa và các sản phẩm sữa dạng lỏng;
- Sữa bột, bột của dịch tách ra khi sản xuất phomat có đông, bột bơ loãng và lactoza;
- Phomat;
- Casein axit, casein lactic, casein rennet;
- Caseinat, bột của dịch sữa axit;
- Bơ;
- Sản phẩm sữa đông lạnh (kể cả kem lạnh thực phẩm);
- Custard, món tráng miệng và váng kem.

Chú thích 1 - Phương pháp này không thích hợp đối với số lượng lớn nấm men không bền nhiệt (trong phomat tươi) Trong các trường hợp như thế, thích hợp hơn là sử dụng phương pháp phủ thạch lên bề mặt.

2. Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 7218 : 1985 Vi Sinh vật học - Hướng dẫn chung về kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989) Sữa và các sản phẩm sữa - Chuẩn bị mẫu thử và các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh.

ISO 707 : 1985 Sữa và các sản phẩm sữa - Các phương pháp lấy mẫu.

TCVN 4550 : 1988 (ISO 5725) Độ chính xác của các phương pháp thử nghiệm - Xác định độ lặp lại và độ tái lập cho phương pháp thử chuẩn bằng các phương pháp thử của liên phòng thí nghiệm.

3. Định nghĩa

Áp dụng định nghĩa sau đây trong tiêu chuẩn này:

3.1. Nấm men và nấm mốc - Các vi sinh vật ở 25°C, dưới các điều kiện qui định trong tiêu chuẩn này tạo thành các khuẩn lạc.

4. Nguyên tắc

4.1. Chuẩn bị các đĩa nuôi cấy, sử dụng môi trường nuôi cấy chọn lọc và một lượng mẫu thử xác định nếu như sản phẩm dạng lỏng, hoặc huyền phù ban đầu khi sản phẩm dạng khác.

Chuẩn bị các đĩa khác trong cùng một điều kiện, với các dung dịch pha loãng thập phân hoặc huyền phù từ mẫu thử.

4.2. Nuôi ươm các đĩa 5 ngày, ở 25°C, trong môi trường có không khí.

4.3. Tính số đơn vị khuẩn lạc tạo thành (CFU) của nấm men và/hoặc nấm mốc trong 1 gam hoặc trong 1 mililit sản phẩm từ số khuẩn lạc thu được trên đĩa đã chọn ở các độ pha loãng sao để có được kết quả đúng.

5. Chất pha loãng và môi trường nuôi cấy

5.1. Khái quát

Hướng dẫn chung, xem ISO 7218.

5.2. Nguyên liệu chính

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989)

5.3. Chất pha loãng dùng cho các mục đích chung

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989).

5.4. Chất pha loãng dùng cho các mục đích riêng biệt

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989).

5.5. Phân phối, khử trùng và bảo quản chất pha loãng

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989).

5.6. Môi trường cao men/ dextroza / oxitettraxilin/ thạch

5.6.1. Môi trường cơ bản

5.6.1.1. Thành phần

Bột cao men	5,0 g
Dextroza ($C_6H_{12}O_6$)	20,0 g
Thạch	10 g đến 15 g ¹⁾
Nước	900 ml
¹⁾ Tùy theo độ đông của thạch	

5.6.1.2. Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước, đun nóng nếu cần. Nếu cần, chỉnh pH để sau khi khử trùng pH là 6,6, ở 25°C.

Khử trùng bằng hấp trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121°C ± 1°C khoảng 15 phút.

5.6.2. Dung dịch oxitettraxilin

5.6.2.1. Thành phần

Oxitetraxilin hidroclorua ($C_{22}H_{30}N_2O_{11}$) . HCl	50 mg
Nước	50 ml

5.6.2.2. Chuẩn bị

Hoà tan oxitetraxilin trong nước. Chuẩn bị dung dịch mới trước mỗi lần sử dụng. Khử trùng dung dịch bằng cách lọc.

5.6.3. Môi trường hoàn chỉnh

5.6.3.1. Thành phần

Oxitetraxiolin hidroclorua	1 0 ml
Môi trường cơ bản	90 ml

5.6.3.2. Chuẩn bị

Làm nguội môi trường cơ bản đã khử trùng (5.6.1) tới 45°C. Ngay trước khi sử dụng, đưa dung dịch oxitetraxilin (5.6.2) về 45°C và cho 10 ml dung dịch này vào 90 ml môi trường cơ bản.

5.7. *Môi trường cao men / dextroza / cloramphenicol / thạch*

5.7.1. Thành phần

Bột cao men	5,0 g
Dextroza ($C_6H_{12}O_6$)	20,0 g
Cloramphenicol ($C_{11}H_{22}Cl_2N_2O_5$)	0,1 g ¹⁾
Thạch	12 đến 15 g ²⁾
Nước	1000 ml
¹⁾ Để thu được nồng độ cuối cùng của môi trường là 100 µg/ml.	
²⁾ Tùy theo độ đông của thạch.	

5.7.2. Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước, đun nóng nếu cần.

Nếu cần, chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là 6,6, ở 25°C.

Phân phối môi trường thạch vào các hộp đựng thích hợp (6.8).

Khử trùng bằng hấp trong nồi hấp áp lực (6.1), ở 121°C ± 1°C 15 phút.

6. Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Chú ý - Phải khử trùng tất cả các dụng cụ tiếp xúc với mẫu thử, chất pha loãng, dung dịch pha loãng, hoặc tiếp xúc với môi trường nuôi cấy phù hợp với TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989), (6.1).

Chú thích 2 - Có thể dùng các dụng cụ sử dụng một lần để thay cho các dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần, nếu như nó phù hợp với các yêu cầu qui định.

Sử dụng các thiết bị thông thường của phòng thí nghiệm vi sinh, các thiết bị cần thiết để xử lý mẫu thử và các dung dịch pha loãng theo qui định của TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989) và đặc biệt là:

6.1. *Thiết bị để khử trùng khô (lò sấy) hoặc khử trùng ướt (nồi hấp), xem ISO 7218.*

6.2. *Tủ ấm, có khả năng hoạt động ở 25°C ± 1°C.*

- 6.3. **Đĩa Petri**, có đường kính từ 90 mm đến 100 mm.
- 6.4. **Pipet chia độ**, được nhét nút bông, đã hiệu chỉnh dung tích $1 \text{ ml} \pm 0,02 \text{ ml}$ hoặc $10 \text{ ml} \pm 0,2 \text{ ml}$ hoặc $11 \text{ ml} \pm 0,2 \text{ ml}$.
- 6.5. **Nồi cách thủy**, có khả năng hoạt động ở $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.
- 6.6. **Thiết bị đếm khuẩn lạc**, bao gồm một bộ phận chiếu sáng có nền đen, được gắn với kính lúp có độ khuếch đại 1,5 lần và có một dụng cụ đếm cơ hoặc điện tử.
- 6.7. **pH mét bù nhiệt**, chính xác tới $\pm 0,1$ đơn vị pH, ở 25°C .
- 6.8. **Chai hoặc bình để nuôi cấy mẫu**

Chú thích 3 - Có thể dùng chai hoặc bình có nắp xoáy, bằng kim loại không độc.

7. Lấy mẫu.

Lấy mẫu theo ISO 707.

Chú thích 4 - Khi phomat đã phủ kín nấm men và nấm mốc thì phải loại bỏ lớp phủ khỏi mẫu thử. Trong những trường hợp như thế phải dùng dao đã khử trùng để cắt bỏ lớp vỏ trước khi lấy mẫu.

8. Cách tiến hành.

Chú thích 5 - Để tăng độ chính xác của phương pháp, việc chuẩn bị các dung dịch pha loãng phải được chuẩn hóa cẩn thận. Những yếu tố tác động đến độ chính xác là:

- Kiểu loại thiết bị khuấy trộn;
- Thời gian khuấy trộn;
- Chất pha loãng;
- Thời gian để cho các hạt to lắng xuống;
- Thời gian trộn cho phép khi chuẩn bị các dung dịch loãng thập phân.

Chú ý - Phải thực hiện các thao tác vô trùng thông thường. Những thao tác qui định trong 8.1 và 8.2 không được tiến hành dưới ánh nắng mặt trời.

8.1. Chuẩn bị mẫu thử và dung dịch pha loãng ban đầu

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989).

8.2. Dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo Xem

TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989).

8.3. Thời gian tiến hành

Xem TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261 : 1989); 8.3.

8.4. Cấy và nuôi ếm

8.4.1. Lấy hai đĩa Petri (6.3) vô trùng. Dùng một pipet vô trùng (6.4) cho vào mỗi đĩa 1 ml mẫu thử, nếu là dạng lỏng, hoặc 1 ml chất huyền phù ban đầu nếu là sản phẩm dạng khác.

8.4.2. Lấy tiếp hai đĩa Petri vô trùng.

Dùng một pipet vô trùng khác, cho vào mỗi đĩa 1 ml dung dịch pha loãng 10^{-1} (sản phẩm ở dạng lỏng), hoặc 1 ml dung dịch pha loãng 10^{-2} (sản phẩm ở dạng khác).

8.4.3. Nếu cần, lặp lại thao tác này, sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo.

- 8.4.4. Rót vào mỗi đĩa Petri khoảng 15 ml môi trường chứa oxitettraxilin (5.6), hoặc môi trường chứa cloramphenicol (5.7) đã được làm cho nóng chảy từ trước và giữ ở 45°C trong nồi cách thủy (6.5).
- 8.4.5. Khuấy trộn thật kỹ chất cấy với môi trường bằng cách xoay đĩa Petri và để cho hỗn hợp đông đặc bằng cách đặt các đĩa Petri này trên một mặt phẳng nằm ngang, mát.
- 8.4.6. Thời gian từ khi chuẩn bị dung dịch pha loãng thứ nhất đến khi trộn chất nuôi cấy với môi trường không được vượt quá 15 phút.
- 8.4.7. Chuẩn bị đủ số đĩa đối chứng để kiểm tra độ vô trùng.
- 8.4.8. Lật ngược các đĩa đã cấy xong (8.4.5) và đặt chúng vào tủ ẩm (6.2) 4 ngày, ở nhiệt độ 25°C.

Chú thích 6 - Để tránh hiện tượng lan rộng cần phải để phòng như sau:

- Phủ thêm một lớp môi trường nuôi cấy lên trên mặt các đĩa đã cấy sau khi đã đông đặc, hoặc
- Nhỏ thêm một giọt glyxerol lên trên giấy lọc của nắp đĩa.

- 8.4.9. Không chồng quá 6 đĩa lên nhau. Để các chồng đĩa tách xa hẳn nhau, cũng như xa thành và xa nóc tủ ẩm.

8.5. Đọc kết quả

- 8.5.1. Đếm số khuẩn lạc trong mỗi đĩa; tránh đếm nhầm các khuẩn lạc mọc bất thường. Nếu cần, phân biệt các khuẩn lạc nấm men và nấm mốc dựa trên cơ sở đặc tính hình thái sinh vật. Xem 8.6.
- 8.5.2. Chỉ giữ lại các đĩa có từ 10 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc. Nếu các phần của đĩa bị nấm mốc che phủ; hoặc nếu không thể đếm các khuẩn lạc riêng biệt, thì đếm các khuẩn lạc trong các đĩa có độ pha loãng cao hơn tiếp theo, thậm chí số khuẩn lạc đó có thể ít hơn 10. Trong trường hợp như thế tiến hành theo 9.2.

8.6. Khẳng định

Phân biệt các chấm đen hoặc các khuẩn lạc nghi ngờ bằng cách kiểm tra qua kính hiển vi. Nếu cần, khẳng định ít nhất là $\sqrt{n}$ các khuẩn lạc xác định bằng kính hiển vi, trong đó n là số khuẩn lạc đếm được.

9. Biểu thị kết quả

- 9.1. Chỉ giữ lại các đĩa có ít nhất là 10 khuẩn lạc, nhiều nhất là 150 khuẩn lạc.
Tính số CFU của nấm mốc và / hoặc nấm men, N , trong 1 gam hoặc trong 1 mililit sản phẩm, theo công thức:

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

Trong đó:

$\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trong tất cả các đĩa được giữ lại;

n_1 là số đĩa của độ pha loãng thứ nhất có chứa từ 10 đến 150 khuẩn lạc;

n_2 là số đĩa của độ pha loãng thứ hai có chứa từ 10 đến 150 khuẩn lạc;

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất.

Chú thích 7 - Nếu có nhiều hơn hai độ pha loãng có thể đếm được, cho kết quả từ 10 đến 150 khuẩn lạc thì công thức phải được sửa đổi, có tính đến những độ pha loãng tiếp theo đó. Với ba độ pha loãng thì theo công thức:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3)d}$$

Trong đó:

n_3 là số đĩa của độ pha loãng thứ 3 được giữ lại, có chứa từ 10 đến 150 khuẩn lạc.

Làm tròn số kết quả thu được đến 2 chữ số có nghĩa. Khi số cần làm tròn là 5 mà không có chữ số có nghĩa nào đứng theo sau thì làm tròn số đứng trước chữ số 5 cho thành số chẵn. Thí dụ: 28.500 làm tròn thành 28.000, và 11.500 được làm tròn thành 12.000.

Lấy kết quả là số CFU nấm mốc và / hoặc nấm men có trong 1 mililit hoặc trong 1 gam sản phẩm, biểu thị bằng số từ 1,0 đến 9,9 nhân với 10^x , trong đó x là lũy thừa tương ứng của 10.

Thí dụ:

Việc đếm khuẩn lạc CFU của nấm men và/ hoặc nấm mốc cho kết quả sau (hai đĩa Petri cho mỗi độ pha loãng đã được ủ):

- Độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) được giữ lại chứa 83 và 97 khuẩn lạc
- Độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) được giữ lại chứa 33 và 28 khuẩn lạc.

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{83 + 97 + 33 + 28}{[2 + (0,1 \times 2)]10^{-2}} = \frac{241}{0,022} = 10954$$

Làm tròn kết quả như hướng dẫn trên (9.1) thu được 11.000 hoặc 11×10^4 CFU của nấm men và / hoặc nấm mốc có trong một gam, hoặc một mililit sản phẩm.

- 9.2. Nếu có hai đĩa tương ứng với mẫu thử (sản phẩm lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) có chứa ít hơn 10 khuẩn lạc thì báo cáo kết quả như sau:
 - Ít hơn 10 CFU của nấm men và / hoặc nấm mốc có trong một mililit (sản phẩm lỏng)
 - Ít hơn $10 \times 1/d$ CFU của nấm men và / hoặc nấm mốc có trong một gam (sản phẩm dạng khác), trong đó d là hệ số pha loãng của chất huyền phù ban đầu.
- 9.3. Nếu tất cả các đĩa đều chứa nhiều hơn 150 khuẩn lạc thì tính số lượng ước tính từ các đĩa có số khuẩn lạc gần 150 nhất và nhân số này với số nghịch đảo của hệ số pha loãng cao nhất. Báo cáo kết quả theo “số lượng đơn vị khuẩn lạc CFU nấm men và / hoặc nấm mốc ước tính trong một gam hoặc một mililit sản phẩm”.

10. Độ lặp lại

Độ chênh lệch tuyệt đối giữa kết quả thu được từ hai lần thử nghiệm riêng rẽ, khi sử dụng cùng một phương pháp, phân tích trên cùng nguyên liệu, do cùng một người tiến hành trong cùng một phòng thí nghiệm, dùng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được vượt quá 30% của kết quả thấp hơn.

Chú thích

8) Nếu các trường hợp không thỏa mãn yêu cầu về độ lặp lại là 5%, hoặc lớn hơn thì cần xem xét nguồn gốc có khả năng gây ra sai lỗi.

9) Định nghĩa về độ lặp lại xem TCVN 4550 : 1988 (ISO 5725).

11. Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả phải chỉ ra phương pháp đã sử dụng, kết quả thử nghiệm thu được và phương pháp biểu thị đã sử dụng. Cũng phải đề cập đến tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả.

Báo cáo kết quả cũng bao gồm tất cả mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử.

SỮA VÀ CÁC SẢN PHẨM SỮA

Lấy mẫu - Kiểm tra theo dấu hiệu định lượng

Milk and milk products - Sampling - Inspection by variables

TCVN 6267: 1997 hoàn toàn tương đương với ISO 8197 : 1988 (E);

1. Phạm vi áp dụng.

Tiêu chuẩn này mô tả cơ sở của các phương án lấy mẫu để kiểm tra theo dấu hiệu định lượng của sữa và sản phẩm sữa.

Tiêu chuẩn này trước hết sử dụng trong các điều kiện sau đây:

- a) Khi qui trình kiểm tra nhằm áp dụng cho một loạt lô hàng liên tiếp của các sản phẩm cụ thể, do một đơn vị sản xuất, sử dụng một qui trình sản xuất.
- b) Khi chỉ có một đặc trưng chất lượng riêng lẻ, x , cần được đo trên một thang đo liên tục, được đưa ra xem xét (nếu có vài đặc tính quan trọng như thế, tiêu chuẩn này áp dụng cho từng đặc tính riêng rẽ);
- c) Khi dây chuyền sản xuất ổn định (theo kiểm tra thống kê) và đặc trưng chất lượng x , được phân bố theo luật phân bố chuẩn hoặc gần sát với luật này;
- d) Khi bản hợp đồng hoặc bản qui định kỹ thuật xác định mức giới hạn kỹ thuật trên, U , mức giới hạn kỹ thuật dưới, L , hoặc cả hai

Chú thích - Sản phẩm có chất lượng phù hợp với yêu cầu của bản hợp đồng hoặc qui định kỹ thuật nếu đặc trưng chất lượng, x , đo được thoả mãn một trong các điều kiện sau đây:

$$x \leq U \quad \dots (1)$$

$$\text{hoặc } x \geq L \quad \dots (2)$$

$$\text{hoặc } x \leq U \text{ và } x \geq L \quad \dots (3)$$

Các điều kiện (1) và (2) được gọi là các trường hợp có giới hạn yêu cầu kỹ thuật đơn và điều kiện (3) là trường hợp có giới hạn kỹ thuật từ hai phía.

Tiêu chuẩn này không áp dụng cho trường hợp kiểm tra khuyết tật vi sinh vật.

2. Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 707 Sữa và các sản phẩm sữa - Các phương pháp lấy mẫu.

ISO 2859, TCVN 2600 : 1978 Thông tin chung về kiểm tra lấy mẫu và hướng dẫn sử dụng các bảng.

ISO 3534 : 1977 Thống kê - Thuật ngữ và ký hiệu.

ISO 3951 : 1981 Qui trình lấy mẫu và sơ đồ kiểm tra định lượng theo phần trăm khuyết tật.

3. Định nghĩa

Áp dụng các định nghĩa nêu trong ISO 3534 cho tiêu chuẩn này.

4. Chọn phương án lấy mẫu

4.1. Phân loại khuyết tật.

Trước khi chọn một phương án lấy mẫu, bản hợp đồng hoặc qui định kỹ thuật cần định nghĩa rõ tất cả các khuyết tật trầm trọng, khuyết tật nặng và khuyết tật nhẹ sao cho tất cả mọi người sử dụng hợp đồng, qui định kỹ thuật hoặc tài liệu về phương án lấy mẫu hoặc có liên quan đến nó đều hiểu được.

4.1.1. Khuyết tật trầm trọng là khuyết tật làm cho sản phẩm không thể chấp nhận được.

Chú thích - Kiểm tra theo dấu hiệu định lượng không được áp dụng đối với khuyết tật trầm trọng. Đối với loại khuyết tật này phải áp dụng kiểm tra theo dấu hiệu loại trừ [xem TCVN 6266 : 1997 (ISO 5538:1987), Sữa và sản phẩm sữa - Kiểm tra theo dấu hiệu loại trừ].

4.1.2. Khuyết tật nặng là khuyết tật làm cho sản phẩm dường như không phù hợp cho việc sử dụng, nghĩa là trong trường hợp của sữa và các sản phẩm sữa không thích hợp để bán cho người tiêu dùng. Một khuyết tật nặng có thể làm hư hỏng sản phẩm, hoặc trở nên không thích hợp để bán hoặc chế biến. Các thí dụ bao gồm:

- a) Khuyết tật về thành phần, khi nó ảnh hưởng đến việc duy trì chất lượng;
- b) Nhiễm bẩn từ các chất bảo quản.

4.1.3. Khuyết tật nhẹ là một sự sai lệch so với yêu cầu kỹ thuật, nhưng không làm cho sản phẩm không phù hợp để sử dụng và bán, cũng không làm cho sản phẩm bị hư hỏng; thí dụ : Một sản phẩm có thành phần hoá học, hoặc khối lượng tịnh nằm ngoài nhưng vẫn gần với giới hạn yêu cầu kỹ thuật.

4.2. Chọn mức kiểm tra và mức chất lượng chấp nhận (AQL),

Xem ISO 3951 : 1981, điều 11.

Các phương án lấy mẫu đối với các khuyết tật nặng được chọn từ các bảng của ISO 3951 sử dụng AQL không lớn hơn 6,5%.

Các phương án lấy mẫu đối với các khuyết tật nhẹ được chọn từ các bảng của ISO 3951 sử dụng AQL không lớn hơn 10%.

5. Lấy mẫu và qui trình kiểm tra

5.1. Phương pháp lấy mẫu

Tiến hành lấy mẫu theo các phương pháp qui định trong ISO 707.

5.2. Cách tiến hành

5.2.1. Lấy mẫu gồm n cá thể một cách ngẫu nhiên từ lô hàng theo ISO 2859 : 1974, add. 1 : 1977, điều 15.

5.2.2. Kiểm tra từng cá thể đó một cách riêng rẽ. Tổng các giá trị của n cá thể $(x_1, \dots, x_n)$.

5.2.3. Tính giá trị trung bình, $\bar{x}$ của n kết quả theo công thức:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Trong đó

x_i là giá trị thu được đối với cá thể thứ i trong mẫu gồm n cá thể ($i = 1, \dots, n$);

n là số lượng cá thể có trong mẫu thử.

5.2.4. Tính độ lệch chuẩn của mẫu, s , theo công thức :

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Trong đó các ký hiệu có cùng ý nghĩa như trong 5.2.3.

5.2.5. Tính các giá trị Q_L và / hoặc Q_U theo công thức :

$$Q_L = \frac{\bar{x} - L}{s}$$

và

$$Q_U = \frac{U - \bar{x}}{s}$$

Trong đó

$\bar{x}$ là giá trị trung bình tính theo 5.2.3;

s là độ lệch chuẩn tính theo 5.2.4;

L là giới hạn yêu cầu kỹ thuật dưới;

U là giới hạn yêu cầu kỹ thuật trên.

Chú thích – Tính giá trị Q_L nếu đặc trưng đo được có giới hạn kỹ thuật dưới, tính Q_U nếu đặc trưng đo được có giới hạn kỹ thuật trên và tính cả hai Q_L và Q_U , nếu đặc trưng đo được có giới hạn yêu cầu kỹ thuật từ hai phía.

6. Tính phù hợp

Lô hàng được coi là phù hợp yêu cầu kỹ thuật nếu như:

a) Trong trường hợp giới hạn yêu cầu kỹ thuật dưới:

$$Q_L \geq k$$

b) Trong trường hợp giới hạn yêu cầu kỹ thuật trên:

$$Q_U \geq k$$

c) Trong trường hợp giới hạn từ hai phía:

$$Q_L \geq k \text{ và } Q_U \geq k$$

Trong đó k là hằng số chấp nhận của phương án lấy mẫu (xem phụ lục A).

Lô hàng bị coi là không phù hợp yêu cầu nếu không thoả mãn điều kiện tương ứng a), b) hoặc c).

PHỤ LỤC A

(Qui định)

KIỂM TRA CÁC PHƯƠNG ÁN LẤY MẪU THEO BIẾN ĐỔI

Phụ lục này đưa ra sáu phương án lấy mẫu điển hình dựa vào AQLs 1%, 1,5%, 2,5%, 4%, 6,5% và 10% ở mức kiểm tra 1 đối với kiểm tra thường, kiểm tra ngặt và kiểm tra giảm. Việc thay đổi các quy luật được ghi trong ISO 3951.

Bảng A.1 - Mức kiểm tra 1 - AQL = 1%

Cỡ lô hàng	Kiểm tra thường		Kiểm tra ngặt		Kiểm tra giảm	
	n	k	n	k	n	k
Đến 50	4	1,45	5	1,65	4	1,34
Từ 51 đến 90	5	1,53	5	1,65	4	1,34
Từ 91 đến 150	7	1,62	7	1,75	4	1,34
Từ 151 đến 280	10	1,72	10	1,84	4	1,34
Từ 281 đến 500	15	1,79	15	1,91	5	1,40
Từ 501 đến 1200	20	1,82	20	1,96	7	1,50
Từ 1201 đến 3200	25	1,85	25	1,98	10	1,58
Từ 3201 đến 10000	35	1,89	35	2,03	15	1,65
Từ 10001 đến 35000	50	1,93	50	2,08	20	1,69
Từ 35001 đến 150000	75	1,98	75	2,12	25	1,72
Từ 150001 đến 500000	100	2,00	100	2,14	35	1,76
Từ 500001 trở lên	150	2,03	150	2,18	50	1,80

Bảng A.2 - Mức kiểm tra 1 - AQL = 1,5%

Cỡ lô hàng	Kiểm tra thường		Kiểm tra ngặt		Kiểm tra giảm	
	n	k	n	k	n	k
Đến 50	4	1,34	4	1,45	3	1,12
Từ 51 đến 90	5	1,40	5	1,53	3	1,12
Từ 91 đến 150	7	1,50	7	1,62	3	1,12
Từ 151 đến 280	10	1,58	10	1,72	4	1,17
Từ 281 đến 500	15	1,65	15	1,79	5	1,24
Từ 501 đến 1200	20	1,69	20	1,82	7	1,33
Từ 1201 đến 3200	25	1,72	25	1,85	10	1,41
Từ 3201 đến 10000	35	1,76	35	1,89	15	1,47
Từ 10001 đến 35000	50	1,80	50	1,93	20	1,51
Từ 35001 đến 150000	75	1,84	75	1,98	25	1,53
Từ 150001 đến 500000	100	1,86	100	2,00	35	1,57
Từ 500001 trở lên	150	1,89	150	2,03	50	1,61

Bảng A.3 – Mức kiểm tra 1 – AQL = 2,5%

Cỡ lô hàng	Kiểm tra thường		Kiểm tra ngặt		Kiểm tra giảm	
	n	k	n	k	n	k
Đến 25	3	1,12	4	1,34	3	0,958
Từ 26 đến 50	4	1,17	4	1,34	3	0,958
Từ 51 đến 90	5	1,24	5	1,40	3	0,958
Từ 91 đến 150	7	1,33	7	1,50	3	0,958
Từ 151 đến 280	10	1,41	10	1,58	4	1,01
Từ 281 đến 500	15	1,47	15	1,65	5	1,07
Từ 501 đến 1200	20	1,51	20	1,69	7	1,15
Từ 1201 đến 3200	25	1,53	25	1,72	10	1,23
Từ 3201 đến 10000	35	1,57	35	1,76	15	1,30
Từ 10001 đến 35000	50	1,61	50	1,80	20	1,33
Từ 35001 đến 150000	75	1,65	75	1,84	25	1,35
Từ 150001 đến 500000	100	1,67	100	1,86	35	1,39
Từ 500001 trở lên	150	1,70	150	1,89	50	1,42

Bảng A.4 – Mức kiểm tra 1 – AQL = 4%

Cỡ lô hàng	Kiểm tra thường		Kiểm tra ngặt		Kiểm tra giảm	
	n	k	n	k	n	k
Đến 25	3	0,958	3	1,12	3	0,765
Từ 26 đến 50	4	1,01	4	1,17	3	0,765
Từ 51 đến 90	5	1,07	5	1,24	3	0,765
Từ 91 đến 150	7	1,15	7	1,33	3	0,765
Từ 151 đến 280	10	1,23	10	1,41	4	0,814
Từ 281 đến 500	15	1,30	15	1,47	5	0,874
Từ 501 đến 1200	20	1,33	20	1,51	7	0,955
Từ 1201 đến 3200	25	1,35	25	1,53	10	1,03
Từ 3201 đến 10000	35	1,39	35	1,57	15	1,09
Từ 10001 đến 35000	50	1,42	50	1,61	20	1,12
Từ 35001 đến 150000	75	1,46	75	1,65	25	1,14
Từ 150001 trở lên	100	1,48	100	1,67	35	1,18

Bảng A.5 - Mức kiểm tra 1 - AQL = 6,5%

Cỡ lô hàng	Kiểm tra thường		Kiểm tra ngặt		Kiểm tra giảm	
	n	k	n	k	n	k
Đến 25	3	0,765	3	0,958	3	0,566
Từ 26 đến 50	4	0,814	4	1,01	3	0,566
Từ 51 đến 90	5	0,874	5	1,07	3	0,566
Từ 91 đến 150	7	0,955	7	1,15	3	0,566
Từ 151 đến 280	10	1,03	10	1,23	4	0,617
Từ 281 đến 500	15	1,09	15	1,30	5	0,675
Từ 501 đến 1200	20	1,12	20	1,33	7	0,755
Từ 1201 đến 3200	25	1,14	25	1,35	10	0,828
Từ 3201 đến 10000	35	1,18	35	1,39	15	0,886
Từ 10001 đến 35000	50	1,21	50	1,42	20	0,917
Từ 35001 trở lên	75	1,24	75	1,46	25	0,936

Bảng A.6 - Mức kiểm tra 1 - AQL = 10%

Cỡ lô hàng	Kiểm tra thường		Kiểm tra ngặt		Kiểm tra giảm	
	n	k	n	k	n	k
Đến 25	3	0,566	3	0,765	3	0,341
Từ 26 đến 50	4	0,617	4	0,814	3	0,341
Từ 51 đến 90	5	0,675	5	0,874	3	0,341
Từ 91 đến 150	7	0,755	7	0,955	3	0,341
Từ 151 đến 280	10	0,828	10	1,03	4	0,393
Từ 281 đến 500	15	0,886	15	1,09	5	0,455
Từ 501 đến 1200	20	0,917	20	1,12	7	0,536
Từ 1201 đến 3200	25	0,936	25	1,14	10	0,611
Từ 3201 đến 10000	35	0,969	35	1,18	15	0,664
Từ 10001 trở lên	50	1,00	50	1,21	20	0,695

SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA

Xác định dư lượng hợp chất clo hữu cơ (thuốc trừ sâu)

Phần 1: Xem xét chung và phương pháp chiết

*Milk and milk products - Determination of residues
of organochlorine compounds (pesticides)
Part 1: General considerations and extraction methods*

TCVN 7082 – 1 : 2002 hoàn toàn tương đương với ISO 3890 – 1 : 2000;

Cảnh báo - Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các chất liệu, thiết bị và các thao tác nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đề cập đến các vấn đề an toàn khi sử dụng chúng.

Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn qui định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này mô tả các xem xét chung và phương pháp chiết để xác định dư lượng của thuốc trừ sâu clo hữu cơ trong sữa và các sản phẩm sữa.

Phụ lục A quy định phương pháp chiết các sản phẩm có hàm lượng chất béo cao.

Phụ lục B đưa ra hướng dẫn cho các phép phân tích khi có mặt biphenyl đã polyclo hoá (PCB).

Khả năng áp dụng của các phương pháp khác nhau được nêu trong bảng 1.

Bảng 1. Khả năng áp dụng của các phương pháp khác đối với các hợp chất khác nhau

Phương pháp	α -HCH	β -HCH	γ -HCH	Andrin/ dieltrin	Heptaclo Heptaclo epoxit	DDT DDE TDE Izome	Clodan Oxy- clodan	Endrin	Denta- keto- endrin	HCB
A	+	+	+	+	+	+	+	+		-
B	+	+	+	+	+	+	+	+		-
C	+	+	+	+	+	+	+	+		+
D	+	+	+	+	+	+	+	+		+
E	+	+	+	+	+	+	+	+		+
F	+	+	+	+	+	+	+	+		+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Ký hiệu: + có khả năng áp dụng

- không có khả năng áp dụng

2. Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 3890 - 2 : 2002 (ISO 3890 - 2 : 2000) Sữa và các sản phẩm sữa - Xác định dư lượng hợp chất clo hữu cơ (thuốc trừ sâu) - Phần 2: Các phương pháp làm sạch dịch chiết thô và thử khẳng định.

TCVN 6910 - 1 : 2001 (ISO 5725 - 1 : 1994) Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 1 : Nguyên tắc và định nghĩa chung.

TCVN 6910 - 2 : 2001 (ISO 5725 - 2 : 1994) Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.

3. Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1. *Hàm lượng các hợp chất clo hữu cơ (contents of organochlorine compounds):*

Phần khối lượng của các chất xác định được bằng các qui trình quy định trong tiêu chuẩn này.

Chú thích - Hàm lượng các hợp chất clo hữu cơ được biểu thị bằng miligam trên kilogam chất béo hoặc sản phẩm (đối với các sản phẩm có hàm lượng chất béo thấp).

4. Nguyên tắc

Chú thích - Các phương pháp này dựa trên quy trình bốn giai đoạn; đôi khi hai giai đoạn được kết hợp toàn bộ hoặc từng phần.

4.1. *Chiết*

Dư lượng trong chất nền của mẫu được chiết bằng các dung môi thích hợp, sao cho thu được phần dư lượng tối đa của dịch chiết và lượng tối thiểu của các chất khác bị chiết đồng thời mà có thể gây nhiễu phép xác định.

4.2. *Làm sạch*

Loại bỏ các chất gây nhiễu ra khỏi dịch chiết để thu được dung dịch chứa phần dư lượng đã chiết được trong một dung môi thích hợp cho việc kiểm tra định lượng bằng phương pháp xác định đã chọn.

4.3. *Xác định*

Hàm lượng các hợp chất clo hữu cơ được xác định bằng phương pháp sắc ký khí lỏng có dò điện tử - E.C.D (electron-capture detection).

4.4. *Thử khẳng định*

Phải khẳng định dư lượng thuốc trừ sâu đã nhận dạng được, đặc biệt trong những trường hợp dư lượng thuốc trừ sâu vượt quá mức tối đa cho phép.

Sự gây nhiễu của PCB và thuốc trừ sâu là một vấn đề thường gặp đối với các cột nhồi và mức độ ảnh hưởng ít hơn đối với các cột mao dẫn. Khi các nồng độ của PCB tương đối cao, thì nên xác định PCB theo IDF 130A [14].

5. Yêu cầu đối với thuốc thử và vật liệu

5.1. *Khái quát*

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích, trừ khi có quy định khác, và nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương. Chung cất lại nước và các dung môi được sử dụng và kiểm tra độ tinh khiết của chúng (xem 5.2). Giới hạn tạp chất của mỗi loại thuốc thử sử dụng không được vượt quá giới hạn quy định trong 14.4. Tuy nhiên, tổng lượng tạp chất của tất cả các thuốc thử sử dụng trong phương pháp có thể lớn hơn giới hạn này. Làm sạch và định kỳ hoạt hoá các chất hấp phụ theo các yêu cầu của các phương pháp phân tích khác nhau. Kiểm tra độ tinh khiết của chúng (xem 5.2.5).

Chú ý: Không để nước, các dung môi, các chất hấp phụ v.v. bị nhiễm bẩn bởi các vật liệu bằng chất dẻo hoặc cao su.

Bảo quản tất cả các thuốc thử, chất hấp phụ... đã được làm sạch trong chai hoặc lọ thủy tinh có nắp thủy tinh hoặc nút polytetrafluoroetylen (PTFE). Không để chúng ngoài không khí sau khi đã làm sạch. Trong nhiều trường hợp, các lá nhôm được rửa bằng axeton có khả năng bảo vệ thích hợp.

5.2. Kiểm tra độ tinh khiết của thuốc thử

5.2.1. Dung môi

Cô đặc các dung môi với hệ số tương ứng trong phương pháp được sử dụng. Kiểm tra độ tinh khiết bằng phương pháp sắc ký khí lỏng (GLC) (xem 6.2). Sắc ký đồ phải không hiển thị mọi tín hiệu nhiễu của chất tạp nhiễm có nồng độ vượt quá giới hạn xác định theo 14.4. Chiết hoặc cô đặc axetonitril, dimetylformamit (DMF) và metylen clorua đến một thể tích giống như đã sử dụng trong phương pháp này và kiểm tra các dung dịch cuối bằng sắc ký khí.

5.2.2. Nước

Chiết 10 phần (theo thể tích) nước với 1 phần (theo thể tích) n-hexan hoặc dầu nhẹ. Tách pha hữu cơ. Cô đặc với hệ số tương ứng trong phương pháp sử dụng và kiểm tra độ tinh khiết bằng phương pháp GLC (xem 6.2).

Sắc ký đồ phải không hiển thị mọi tín hiệu nhiễu của các chất tạp nhiễm có nồng độ vượt quá giới hạn xác định theo 14.4.

5.2.3. Muối vô cơ

Dùng n-hexan hoặc dầu nhẹ để chiết các muối vô cơ (ví dụ muối natri clorua), sau khi đã làm sạch theo các yêu cầu của các phương pháp phân tích khác nhau, và tất cả các dung dịch lỏng được sử dụng. Cô đặc dịch chiết với hệ số tương ứng trong phương pháp sử dụng và thử nghiệm bằng sắc ký khí lỏng (GLC). Sắc ký đồ phải không được hiển thị mọi tín hiệu nhiễu của các tạp chất có nồng độ vượt quá giới hạn xác định trong 14.4.

5.2.4. Bông cotton, bông thủy tinh và bông thạch anh

Sử dụng bộ chiết Soxhlet để chiết các chất này bằng n-hexan và axeton cho đến khi chúng không còn chứa các chất gây nhiễu.

5.2.5. Chất hấp phụ

Rửa giải một lượng chất hấp phụ đúng bằng lượng được sử dụng trong phương pháp phân tích và thể tích hỗn hợp dung môi tương ứng. Cô đặc dịch rửa giải theo hướng dẫn của phương pháp phân tích và kiểm tra độ tinh khiết bằng phương pháp GLC (xem 6.2). Sắc ký đồ không được hiển thị mọi tín hiệu nhiễu của các tạp chất có nồng độ vượt quá giới hạn xác định trong 14.4. Thường xuyên kiểm tra hoạt độ của các chất hấp phụ.

5.2.6. Dung dịch tiêu chuẩn

Sử dụng các vật liệu có độ tinh khiết ít nhất là 95% để chuẩn bị các dung dịch tiêu chuẩn dùng cho phân tích dư lượng thuốc trừ sâu.

Nếu được bảo quản ở -20°C thì nhìn chung chúng có thể bền ít nhất từ 1 năm đến 2 năm. Các dung dịch gốc có nồng độ 1 mg/ml, được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ khoảng 4°C thường bền trong vòng từ 2 tháng đến 3 tháng. Chuẩn bị các dung dịch pha loãng mới ngay trong ngày sử dụng.

Chú thích - Sự thay đổi thể tích do bay hơi dung môi, ví dụ qua những khe hở giữa nắp và cổ bình, có thể là một nguyên nhân gây ra sai số.

Bảo quản các dung dịch tiêu chuẩn trong các lọ thủy tinh trong tủ lạnh và tránh sự nhiễm bẩn có thể xảy ra do các vật liệu bằng chất dẻo hoặc cao su. Không để các dung dịch tiêu chuẩn tiếp xúc với ánh sáng mặt trời hoặc tia cực tím trong thời gian dài. Có thể sử dụng phương pháp khối phổ và sắc ký khí - lỏng để kiểm tra các chất chuẩn dùng trong phân tích về độ nhiễm bẩn. Kinh nghiệm cho thấy rằng các sai sót trong quá trình chuẩn bị, xử lý và bảo quản các chất chuẩn và dung dịch tiêu chuẩn là những nguyên nhân chính gây ra sai số.

6. Yêu cầu đối với thiết bị, dụng cụ

6.1. Khái quát

Làm sạch kỹ tất cả các dụng cụ thủy tinh được dùng trong phép phân tích dư lượng. Có thể dùng dung dịch axit cromic hoặc axit sunphuric nóng để làm sạch. Nếu sử dụng các dung dịch này, cần rửa sạch các dụng cụ thủy tinh, sau đó tráng lại bằng nước cất và axeton trước khi sấy khô. Ngay trước khi dùng, phải tráng lại các dụng cụ thủy tinh này bằng các dung môi được sử dụng để phân tích.

Không sử dụng các loại nút bằng chất dẻo thông thường [ví dụ như nhựa polyvinyl clorua (PVC)] cho các bình chứa các chất chuẩn vì chúng có thể làm nhiễm bẩn chất chuẩn. Cần dùng nút bằng thủy tinh hoặc polytetrafluoroetylen (PTFE). Tương tự, không dùng phễu chiết có nút hoặc van khoá bằng chất dẻo. Chai rửa phải làm hoàn toàn bằng thủy tinh. Thay thế các nút thông thường bằng các nút thủy tinh hoặc nút PTFE.

Hầu hết các phương pháp đều quy định các loại cột sắc ký riêng, chúng được chế tạo đặc biệt và có khoá bằng thủy tinh hoặc PTFE. Tại đỉnh các cột sắc ký này phải có các khớp nối bằng thủy tinh mài để nối với bình chứa dung môi hoặc bộ phận điều chỉnh áp lực. Đôi khi một khớp nối bằng thủy tinh mài ở phía dưới vòi cũng có thể có tác dụng trong việc ứng dụng sức hút khi dùng bình Buchner thích hợp.

Có thể sử dụng hai loại thiết bị có dung môi. Loại thứ nhất là thiết bị cô quay Kuderna - Danish¹⁾ (hoặc tương tự), (xem tài liệu tham khảo [1]), thiết bị này có thể có hoặc không có cột phân đoạn và được gia nhiệt trên một buồng hơi. Loại thứ hai là các loại thiết bị cô quay màng mỏng khác nhau (có bán sẵn trên thị trường), loại thiết bị này cần có nguồn chân không, tốt nhất là bơm chân không sử dụng nước, và có thể gia nhiệt đến nhiệt độ cao hơn 50°C. Cần kiểm tra định kỳ ảnh hưởng của các loại thiết bị cô dung môi về sự thất thoát các thuốc trừ sâu dễ bay hơi. Có thể sử dụng "tác nhân bảo vệ" (propilen glycol, n-undecan hoặc hexadecan) để giảm thiểu sự thất thoát thuốc trừ sâu.

Nếu sử dụng các thiết bị đông hoá, phải thận trọng để đảm bảo rằng chúng hoàn toàn không bị nhiễm bẩn. Kiểm tra bộ phận làm ấm đĩa đáy để phát hiện các khe hở xung quanh đĩa này. Các chất hàn kín có thể là một nguồn gây nhiễm bẩn.

Các ống hình côn gắn với các khớp nối thủy tinh mài tiêu chuẩn 14 mm và có dung tích khoảng 15 ml (nghĩa là có chiều dài ống từ 80 mm đến 90mm) cần cho các phân đoạn cô đặc cuối cùng. Các ống này được gắn khít với các cột micro - Snyder¹⁾ (xem tài liệu tham khảo [2]). Các dung dịch thường được giảm đến thể tích nhỏ cuối cùng bằng cách thổi một luồng không khí hoặc khí nitơ đi qua chúng¹⁾. Không dùng các ống bằng cao su hoặc chất dẻo PVC cho mục đích này: ống PTFE hoặc nylon thường cho thấy ít có nguy cơ bị nhiễm bẩn nhất.

Có thể xử lý giấy lọc bằng dung môi.

Bồn hơi và nồi cách thủy cũng cần có giá đỡ tương thích với các thiết bị được sử dụng.

Đôi khi cần sử dụng cả máy ly tâm có khả năng xử lý khoảng vài trăm mililit nhũ tương với tần số quay từ 2000 vòng/phút đến 4000 vòng/phút.

¹⁾ Đây là những ví dụ về các sản phẩm phù hợp sẵn có. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và tổ chức ISO không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này.

6.2. Thiết bị sắc ký khí lỏng (GLC)

Sử dụng hệ thống sắc ký khí lỏng thích hợp, tốt nhất được trang bị kèm theo bộ gia nhiệt riêng cho bộ bơm, detector và lò cột. Nhìn chung, thiết bị bơm mẫu trực tiếp lên cột sắc ký khí lỏng (GLC) là thích hợp nhất. Mặc dù sự lựa chọn các bộ phận khác nhau trong hệ thống sắc ký khí lỏng GLC là tùy thuộc kinh nghiệm của người phân tích, nhưng cũng cần xem xét các khuyến nghị sau đây:

- a) Các E.C.D (^3H , ^{63}Ni) đã được chứng minh là phù hợp nhất để xác định các hợp chất clo hữu cơ. Điều chỉnh các detector theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Định kỳ kiểm tra sự lệch độ nhạy của detector bằng cách kiểm tra độ tuyến tính của đồ thị hiệu chuẩn dùng các dung dịch tiêu chuẩn của thuốc trừ sâu (xem 5.2.6). Không dùng các detector ^3H nếu yêu cầu nhiệt độ trên 225°C .
- b) Tốt nhất là dùng các cột silica nóng chảy hoặc thủy tinh có độ dài từ 1,5 m đến 3 m và đường kính trong từ 2 mm đến 6 mm.
- c) Sử dụng các vật liệu phụ trợ thích hợp, có chất lượng tốt. (Các vật liệu phụ trợ thích hợp như Gaschrom Q, Chromosorb W - HP, Anachrom Q tương ứng 60/80, 80/100 và 100/120 mesh đã được ứng dụng có hiệu quả)¹⁾.
- d) Rất nhiều pha tĩnh và các hỗn hợp pha tĩnh được sử dụng có hiệu quả phụ thuộc vào số lượng và cả chủng loại thuốc trừ sâu clo hữu cơ, ví dụ:
 - Hydrocacbon: Apiezon L
 - Metylsilicon: DC - 11, DC - 200, OV - 1, QC - 101, SP - 2100, SE-30
 - Metylphenylsilicon: OV - 17, OV - 61, OV - 25, SP - 2250, SE - 52
 - Trifloropropylmetylsilicon: QF - 1, OV - 210, SP - 2401
 - Phenylxianopropylmetylsilicon: OV - 225, XE - 60

Làm lắng một cách cẩn thận các pha tĩnh trên cột phụ, tỷ lệ phụ thuộc vào sự kết hợp của cột phụ / pha được chọn. Trong mọi trường hợp, ổn định các cột mới nhỏ ít nhất 24 h ở nhiệt độ gần với nhiệt độ tương thích tối đa của loại pha tĩnh được sử dụng. Kiểm tra hiệu quả và tính chọn lọc của chúng tại nhiệt độ hoạt động yêu cầu sử dụng hỗn hợp tiêu chuẩn của các hợp chất clo hữu cơ.

Sắc ký khí mao dẫn là một kỹ thuật quan trọng có khả năng chiết tốt hơn so với các cột nhồi. Kỹ thuật mao dẫn được khuyến nghị sử dụng đặc biệt trong trường hợp các chất chiết phức tạp. Tuy nhiên, hết sức chú ý khi sử dụng các ống mao dẫn thủy tinh đã khử hoạt tính, nếu không, ở mức nồng độ picogram, các hợp chất quan tâm sẽ bị thất thoát do bị hấp phụ lên bề mặt thủy tinh. Để tránh hiện tượng này, loại cột silica nóng chảy được khuyến nghị sử dụng.

Sử dụng nitơ khô, tinh khiết (không chứa oxy, khi sử dụng E.C.D), hoặc hỗn hợp khí argon/metan (khi dùng E.C.D dạng xung) làm khí mang cho các cột nhồi, với tốc độ dòng khí phụ thuộc vào kích cỡ và loại cột sử dụng. Kiểm soát tốc độ dòng khí theo các đặc tính của cột và detector. Nhìn chung, phải đảm bảo tốc độ dòng khí được kiểm soát càng chính xác càng tốt [$\pm (0,5 \text{ đến } 1,0)\%$ giá trị của tốc độ dòng khí]. Đặt các bộ lọc rây phân tử trong các mạch nguồn và định kỳ phục hồi chúng. Nói tóm tắt, cần đảm bảo các điều kiện của sắc ký khí lỏng (GLC) (nghĩa là chiều dài cột, loại pha tĩnh, bộ bơm, detector, nhiệt độ cột và tốc độ dòng khí .v.v. . .) sao cho việc tách các hợp chất clo hữu cơ càng gần với lượng thực có mặt càng tốt.

7. Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo phương pháp trong TCVN 6400 : 1998 (ISO 707) [3].

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

8. Chuẩn bị mẫu thử

8.1. Sữa

Điều chỉnh nhiệt độ của mẫu thử về 35°C đến 40°C, bằng cách sử dụng nổi cách thủy, nếu cần. Trộn kỹ mẫu thử một cách nhẹ nhàng bằng cách lật đi lật lại hộp chứa mẫu mà không tạo bọt hoặc đánh kem và làm nguội nhanh đến nhiệt độ khoảng 20°C.

8.2. Sữa bột

Lắc và đảo chiều hộp chứa. Mở nắp hộp, rót từ từ mẫu thử sang hộp chứa thứ hai (có nắp đậy kín khí) và trộn đều bằng cách chuyển qua chuyển lại mẫu thử, chú ý không để chất béo hay bất kỳ thành phần nào khác của mẫu sót lại trên thành và đáy của hộp thứ nhất. Cuối cùng, chuyển hết mẫu sang hộp chứa thứ hai.

Trường hợp mẫu thử đựng trong các hộp kín, thì đặt các hộp chưa mở này trong nổi cách thủy ở nhiệt độ khoảng từ 40°C đến 60°C, nếu cần. Cứ 15 phút, lấy hộp ra và lắc mạnh. Sau 2 giờ, lấy hẳn hộp ra và để nguội đến nhiệt độ phòng. Mở hẳn nắp hộp, dùng thìa hoặc dao trộn để trộn kỹ lượng sữa trong hộp.

8.3. Sữa đặc có đường

Mở nắp hộp chứa và trộn kỹ lượng sữa bên trong bằng thìa hoặc dao trộn. Sử dụng các động tác vừa tạo chuyển động quay vừa tạo chuyển động lên - xuống sao cho các lớp trên cùng với các phần ở góc và đáy hộp được trộn lẫn với nhau. Không để chất béo hoặc bất kỳ thành phần nào khác của mẫu sót lại trên thành và đáy của hộp. Chuyển hết mẫu thử sang hộp chứa thứ hai (có nắp đậy kín khí). Đậy nắp hộp.

Trường hợp mẫu thử được đựng trong các hộp kín, đặt các hộp chưa mở này trong nổi cách thủy ở nhiệt độ khoảng từ 30°C đến 40°C, nếu cần. Mở nắp hộp, chuyển toàn bộ lượng sữa bên trong ra đĩa có kích thước đủ rộng để có thể trộn được kỹ rồi tiến hành trộn cho đến khi toàn bộ lượng sữa đồng nhất. Trường hợp mẫu thử đựng trong các ống có thể gấp lại được, thì mở ống và chuyển mẫu thử ra một bình chứa. Sau đó cắt mở ống, vét và chuyển toàn bộ lượng mẫu còn dính lại trong ống vào bình chứa nói trên.

8.4. Sản phẩm sữa bột

Trộn kỹ mẫu thử bằng cách quay và đảo ngược vật chứa mẫu nhiều lần. Chuyển toàn bộ mẫu thử vào một vật chứa kín khí có dung lượng đủ lớn, nếu cần.

8.5. Bơ và butterfat

Gia nhiệt mẫu thử đến nhiệt độ khoảng 60°C cho đến khi chất béo tách ra. Gạn mẫu qua nút bông thủy tinh vào phễu thủy tinh đã được gia nhiệt.

8.6. Phomat

Tách chất béo ra khỏi mẫu thử theo quy định trong TCVN 7082 - 2 : 2002 (ISO 3890-2).

8.7. Các sản phẩm sữa khác

Đảm bảo rằng mẫu thử được đồng nhất.

9. Cách tiến hành

9.1. Khái quát

Những người thực hiện phải tự làm quen kỹ với phương pháp phân tích trước khi bắt đầu phép phân tích qui định. Cho chạy các thử mẫu trắng thuốc thử cho đến khi chúng thoả mãn các yêu cầu của phép phân tích.

Đồng thời tiến hành các thử nghiệm phục hồi "sự mất hoạt tính" tại các mức phù hợp cho đến khi chúng thỏa mãn các yêu cầu của phép phân tích (xem điều 13). Tuân thủ một cách chính xác theo cùng một trình tự tiến hành cho mỗi phép phân tích và không có bất cứ một sự thay đổi nào.

Nếu không thể hoàn thành các phép phân tích trong vòng một ngày và cần dùng chúng vào ban đêm, thì phải bảo quản dịch chiết mẫu ở dạng dung dịch trong dung môi khan đựng trong bình có nắp đậy kín, đặt trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ 0°C đến 5°C. Không được dùng quá trình chiết, sắc ký cột v.v...

Chú thích - Cần phải liên tục xem xét áp dụng các phương pháp khác, các kỹ thuật cập nhật hơn hay các kỹ thuật mới cho cùng một kết quả hoặc thậm chí cho kết quả chính xác hơn.

9.2. Chiết

Cân một lượng mẫu thử qui định, tốt nhất là tính bằng gam ($\pm 1\%$). Để các mẫu đông lạnh được rã đông trước khi ngâm vì trong một số trường hợp mẫu đông lạnh có thể gây khó khăn cho quá trình chiết. Thời gian ngâm mẫu ít nhất là 2 phút.

9.3. Làm sạch

Tiến hành quá trình tách trong phễu chiết mỗi lần ít nhất là 2 phút, lắc mạnh phễu và thỉnh thoảng phải cân bằng áp suất bằng cách mở van khoá phễu chiết đã đảo ngược. Nếu lắc mạnh tạo ra thể nhũ tương bền thì tốt nhất là nên lắc nhẹ trong khoảng thời gian dài hơn. Có thể phá vỡ thể nhũ tương bằng cách thêm vào 1 ml đến 2 ml dung dịch natri clorua hoặc natri sunphat bão hoà, hoặc bằng cách làm ấm dưới vòi nước nóng, hay cho ly tâm (xem điều 6). Khi các lớp phân tách, lấy lớp phân cách đã bị nhũ hoá để chiết lại hoặc loại bỏ. Tốc độ rửa giải của các cột sắc ký thường được quy định cụ thể nhưng nhìn chung phải nằm trong khoảng 1 ml/min đến 5 ml/min.

Tại giai đoạn này của qui trình nên bổ sung một lượng đã biết pentaclobenzen dễ bay hơi (hoặc 1,7- dibromoheptan) và chất chuẩn nội bay hơi ít hơn (ví dụ như Mirex: 1,2,3,4 - tetraclobenaphtalen hoặc izodrin). Sử dụng petaclobenzen làm chất chỉ thị đối với lượng thuốc trừ sâu dễ bị thất thoát trong giai đoạn bay hơi bằng cách so sánh chiều cao (diện tích) pic của nó với chiều cao (diện tích) pic thu được khi sử dụng các chất chuẩn nội bay hơi ít hơn. Có thể sử dụng các chất chuẩn nội để nhận biết (thời gian lưu tương đối) và để định lượng.

Không để bay hơi các dung môi hữu cơ đến khô hoàn toàn, trừ khi được quy định.

10. Thử sơ bộ

Bơm vào sắc ký khí (xem 6.2) một thể tích thích hợp từ 1,0 μ l đến 10 μ l, tùy thuộc vào hệ thống các dịch chiết đã làm sạch thu được theo phương pháp phân tích đã sử dụng. Sắc ký đồ thu được có thể hiển thị được cả bản chất và cả nồng độ gần đúng của các hợp chất có mặt trong dịch chiết.

11. Thử định lượng

Nếu phép thử sơ bộ cho thấy dư lượng đạt tới hoặc vượt quá mức cho phép, thì kiểm tra lại kết quả thu được bằng cách sử dụng thêm ít nhất một cột sắc ký khí lỏng của bộ phận khác. Nếu kết quả thu được của cột này giống như lần trước, thì kiểm tra ít nhất là hai dịch chiết mới của mẫu.

Đối với phép thử định lượng, chuẩn bị hai dung dịch tiêu chuẩn (xem 5.2.6) của các hợp chất clo hữu cơ đã nhận biết (xem điều 10) trong dung môi được sử dụng cho dịch chiết cuối cùng, thường là dầu nhẹ hoặc n - hexan. Nồng độ của chúng phải bao trùm dải nồng độ dự kiến có trong dịch chiết cuối cùng (xem điều 10). Sau đó bơm hai dung dịch tiêu chuẩn và dịch chiết cuối cùng với thể tích như nhau vào sắc ký khí (xem 6.2). Tiến hành bơm các phân dịch chiết mẫu thử đã làm sạch cả trước và sau khi bơm hai dung dịch tiêu chuẩn. Đo chiều cao hoặc diện tích pic.

Kết quả thu được từ hai lần bơm bất kỳ của cùng một dung dịch tiêu chuẩn không lệch nhau quá 5%. Việc sử dụng chất chuẩn nội cũng có thể được dùng để định lượng (xem 9.3).

12. Thử khẳng định

Sử dụng các quy trình để thử khẳng định sự nhận dạng các hợp chất clo hữu cơ phát hiện được, đặc biệt trong những trường hợp hàm lượng của chúng vượt quá giới hạn dư lượng tối đa (MRL). Phương pháp mô tả trong TCVN 7082 - 2 (ISO 3890-2) cho phép nhận biết dư lượng thông qua thời gian lưu của các hợp chất clo hữu cơ trên các cột sắc ký khí lỏng (GLC). Sử dụng ít nhất hai cột sắc ký có độ phân cực khác nhau. Ngoài ra, các qui trình như sắc ký mao dẫn thuỷ tinh, sắc ký lớp mỏng, khối phổ, độ tinh khiết (p-value), sắc ký khí lỏng đối với quá trình oxy hoá và các sản phẩm chuyển hoá khác và các kỹ thuật tương tự cũng rất có giá trị. Xem TCVN 7082 - 2 (ISO 3890-2).

13. Đánh giá kết quả

13.1. Tính kết quả

Tính nồng độ của hợp chất clo hữu cơ trong mẫu thử từ tỷ lệ giữa các phản tương ứng trên sắc ký đồ của mẫu và chất chuẩn hoặc của dãy chất chuẩn. Biểu thị nồng độ này theo mẫu thử hoặc chất béo (xem 13.2.1) tùy theo qui trình, sản phẩm và số lượng mẫu thử. Độ thu hồi ít nhất là 80% nếu không kết quả sẽ phải huỷ bỏ (xem điều 9).

13.2. Trình bày và biểu thị kết quả

13.2.1. Thông thường, hàm lượng thuốc trừ sâu clo hữu cơ trong các sản phẩm sữa được biểu thị theo chất béo. Tuy nhiên, trong trường hợp các sản phẩm sữa có hàm lượng chất béo thấp, thì nên biểu thị theo mẫu thử sẽ tốt hơn vì hàm lượng chất béo trong các sản phẩm sữa ít chất béo dao động lớn, phụ thuộc vào phương pháp chiết chất béo được sử dụng (xem phụ lục A về chiết chất béo).

13.2.2. Nên xác định hàm lượng chất béo bằng phương pháp thích hợp (xem tài liệu tham khảo) và ghi lại kết quả cùng với hàm lượng thuốc trừ sâu clo hữu cơ. Tiếp theo, nêu rõ hàm lượng thuốc trừ sâu clo hữu cơ đã được biểu thị theo cách nào, ví dụ miligam trên kilogam theo chất béo hay theo mẫu.

Chú thích - Điểm ngưỡng 2 % chất béo là giá trị thực tiễn có thể thoả thuận được.

13.2.3. Khi giá trị dư lượng không đạt được hay vượt quá mức cho phép, thì phải ghi lại giá trị thu được từ một phép xác định đơn lẻ.

13.2.4. Trong trường hợp có một hoặc nhiều giá trị dư lượng đạt được hay vượt quá mức cho phép, thì cần tiến hành như sau:

- Nêu rõ nồng độ trung bình và dải nồng độ của từng hợp chất clo hữu cơ. Không hiệu chỉnh nồng độ trung bình về phần trăm độ thu hồi các hợp chất clo hữu cơ.
- Nêu rõ phần trăm thu hồi trung bình và giới hạn xác định của từng hợp chất clo hữu cơ tương ứng.
- Nêu chi tiết độ lặp lại thông thường nhận được về mức độ khác nhau giữa các kết quả đo được trong phòng thử nghiệm thông qua các dữ liệu thu được từ việc phân tích các mẫu đã làm mất hoạt tính của cùng một sản phẩm hoặc các mẫu chứa dư lượng còn hoạt tính.
- Nêu chi tiết về độ tái lập thường nhận được ở nồng độ trung bình đo được trong mẫu được ngoại suy từ các dữ liệu đã cho trong 13.2.2.

14. Độ chụm

14.1. Đánh giá độ chụm

Đánh giá độ chụm của phương pháp phân tích theo các yêu cầu của TCVN 6910-1 : 2001 (ISO 5725-1 : 1994) và TCVN 6910-2 : 2001 (ISO 5725-2 : 1994). Một vài tiêu chí chung, dựa trên kinh nghiệm, được đưa ra trong 14.2 và 14.3 như các chỉ dẫn cho các nhà phân tích.

14.2. Độ lặp lại

Mỗi phòng thử nghiệm nên định kỳ xác định độ lặp lại của mình bằng cách phân tích các mẫu đã bị mất hoạt tính các hợp chất clo hữu cơ thích hợp, hoặc, tốt nhất là sử dụng các mẫu chứa dư lượng còn hoạt tính, ở nồng độ gần mức cho phép tối đa. Các mẫu này nên lấy từ cùng một sản phẩm và nên dùng để làm mẫu thông thường và không có bất cứ dấu hiệu nào về bản chất đặc biệt, nếu có thể.

Chênh lệch giữa giá trị lớn nhất và giá trị nhỏ nhất của ba kết quả thử phải nhỏ hơn các giá trị đưa ra trong bảng 2. Xác định các giá trị trung gian bằng cách nội suy từ đồ thị logarit- logarit.

Bảng 2 - Độ lặp lại

Mức dư lượng mg/kg	Chênh lệch mg/kg
0,01	0,005
0,1	0,025
1	0,125
<i>Chú thích – Trong thí dụ này 0,01 mg/kg gần với giới hạn xác định</i>	

14.3. Độ tái lập

Sử dụng bảng 3, các số liệu trong bảng dựa trên các kết quả thực nghiệm. Xác định các giá trị trung gian bằng cách nội suy từ đồ thị logarit- logarit.

Bảng 3 - Độ tái lập

Mức dư lượng mg/kg	Chênh lệch mg/kg
0,01	0,01
0,1	0,05
1	0,25
<i>Chú thích – Trong thí dụ này 0,01 mg/kg gần với giới hạn xác định</i>	

14.4. Giới hạn xác định

Về lý thuyết, giới hạn xác định của sản phẩm có liên quan được xác định là nồng độ của hợp chất clo hữu cơ (tính theo gam trên kilogam) tương ứng với độ cao h của pic thấp nhất có thể đo được, trên sắc ký đồ của dịch chiết sản phẩm, được xác định bằng phương trình sau:

$$h = h_{B1} + 2W_{B1}$$

Trong đó:

h_{B1} là giá trị trung bình bằng số của chiều cao pic của thử mẫu trắng phía trên đường nền thông thường tại thời gian lưu tương ứng;

W_{B1} là giá trị bằng số của biên độ trung bình của các tín hiệu nền của thử mẫu trắng tại thời gian lưu tương ứng (W_{B1} có thể được xác định bằng đồ thị theo độ rộng tín hiệu nền trung bình của thử mẫu trắng).

Giới hạn xác định phụ thuộc vào độ tinh khiết, bản chất của chất nền và điều kiện sắc ký khí lỏng (đặc biệt là loại cột và nhiệt độ cột, khí mang và độ nhạy của detector). Vì những điều kiện này không thể quy định một cách chính xác, nên giới hạn xác định phải được thiết lập cho từng quy trình và trong mỗi phòng thử nghiệm. Về nguyên tắc chung, giới hạn xác định của dư lượng

thuốc trừ sâu nên nhỏ hơn 10% giới hạn dư lượng tối đa của nó. Tuy nhiên, nếu giới hạn dư lượng tối đa là 0,05 mg/kg hoặc nhỏ hơn, thì giới hạn xác định bằng 20% giá trị này là phù hợp, ngoại trừ trường hợp giới hạn dư lượng tối đa đã được quy định bằng hoặc gần mức xác định.

15. Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- Tất cả các thông tin cần thiết để nhận biết hoàn toàn mẫu thử;
- Phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- Phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- Mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được coi là tùy ý lựa chọn, cùng với tất cả các chi tiết bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- Sự hiệu chỉnh đã thực hiện, nếu giá trị thu được lớn hơn 2,5 mg trong thử mẫu trắng về phương pháp;
- Kết quả thu được; và nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

PHỤ LỤC A
(Quy định)

CHIẾT CHẤT BÉO VÀ CÁC HỢP CHẤT CLO HỮU CƠ VÀ XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CHẤT BÉO

A.1. Khái quát

Các hợp chất clo hữu cơ được liên kết với pha chất béo và thường được biểu thị bằng miligam trên kilogam chất béo, đối với sản phẩm chứa hàm lượng chất béo cao (lớn hơn 2%). Trong những trường hợp như vậy, không cần thiết phải xác định hàm lượng chất béo của mẫu nhưng cần xác định dư lượng clo hữu cơ trong một khối lượng đã biết của chất béo chiết được. Nếu hàm lượng chất béo của mẫu thấp (dưới 2%), thì ngoài việc ghi lại hàm lượng clo hữu cơ theo mẫu, cần xác định phần trăm chất béo có trong mẫu.

A.2. Xác định hàm lượng chất béo

Tiến hành xác định hàm lượng chất béo của các mẫu có hàm lượng chất béo thấp (nhỏ hơn 2%) theo tiêu chuẩn thích hợp với sản phẩm tương ứng (xem danh mục tài liệu tham khảo) hoặc theo phương pháp đã biết cho các kết quả tương đương.

Phương pháp dùng bộ chiết Soxhlet không phù hợp để xác định chất béo trong sữa bột. Có thể dùng phương pháp phân tích sử dụng thiết bị hấp thụ hồng ngoại đang được ứng dụng rộng rãi đối với sữa và các sản phẩm sữa để xác định chất béo trong mẫu có hàm lượng chất béo thấp.

A.3. Chiết chất béo và các hợp chất clo hữu cơ

Các phương pháp chiết bao gồm:

- a) Chiết Soxhlet, áp dụng cho các sản phẩm sữa không ở dạng lỏng;
- b) Chiết bằng cột, áp dụng cho tất cả các sản phẩm sữa;
- c) Phương pháp chiết theo AOAC, áp dụng cho sữa và các sản phẩm dạng lỏng.

Chú ý - Không làm bay hơi các dung môi hữu cơ đến khô hẳn, vì sẽ làm thất thoát hợp chất clo hữu cơ.

A.4. Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại phân tích, trừ khi có quy định khác và sử dụng nước cất, hoặc nước khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

A.4.1. Xelit 545²⁾

Trước khi sử dụng, đốt nóng đến 600°C trong 4 giờ. Bảo quản trong bình có nắp kín khí.

A.4.2. Natri sunphat, khan (Na_2SO_4).

Trước khi sử dụng, nung nóng đến 600°C trong 6 giờ và sau đó làm nguội trong bình hút ẩm.

A.4.3. Cát biển, đã được rửa bằng axit (ví dụ Merk No.7712).

Trước khi sử dụng, đốt nóng đến 600°C trong 5 giờ và sau đó làm nguội trong bình hút ẩm.

A.4.4. Dầu nhẹ, nhiệt độ sôi trong khoảng từ 40°C đến 60°C.

Trước khi sử dụng, cho hồi lưu ngược trên các hạt natri hydroxit và chưng cất.

A.4.5. Metanol, (CH_3OH) hoặc etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)

A.4.6. Dietyl ete ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$), không chứa peroxit.

Chưng cất lại trước khi sử dụng.

²⁾ Xelit 545 và Merck số 7712 là những ví dụ về các sản phẩm phù hợp sẵn có. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này.

A.4.7. *n-Hexan* [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$]

Chung cất lại trên các hạt natri hydroxit trước khi sử dụng.

A.4.8. *Axeton* (CH_3COCH_3)

Chung cất lại trên các hạt thuỷ tinh trước khi sử dụng.

A.4.9. *Natri oxalat* ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) hoặc *kalioxalat* ($\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$).

A.5. *Thiết bị, dụng cụ*

Sử dụng các thiết bị và dụng cụ thử nghiệm thông thường, đặc biệt là các dụng cụ, thiết bị dưới đây.

A.5.1. *Tủ sấy*, có khả năng duy trì nhiệt độ trong khoảng $102^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ đến $250^\circ\text{C} \pm 25^\circ\text{C}$.

A.5.2. *Máy ly tâm*, loại chống nổ, được trang bị ống thuỷ tinh dung tích 200 ml đến 300 ml, và có khả năng quay với tần số 2000 vòng/phút đến 4000 vòng/phút.

A.5.3. *Thiết bị chiết Soxhlet, bao gồm:*

- a) Bình đáy tròn, dung tích 500 ml;
- b) Bình chiết, dung tích khoảng 200 ml;
- c) Bộ sinh hàn ngược;
- d) Nguồn nhiệt (ví dụ đèn măng sông đốt nóng).

A.5.4. *Bể cát*, dầu hoặc hơi nước, công suất 400 W.

A.5.5. *Xylanh*, chứa khí trơ khô, gắn với loại xy lanh có đường PTFE.

A.5.6. *Pipet*.

A.5.7. *Cân*, có độ chính xác đến 0,001 g trong dải đo từ 0,01 g đến 1000 g.

A.5.8. *Bộ cô quay*, có bình bay hơi dung tích 500 ml.

A.5.9. *Thiết bị làm nhỏ thực phẩm có nguồn gốc động vật* (ví dụ máy trộn, máy khuấy, hoặc máy xay hình cầu).

A.5.10. *Cột chiết*, bao gồm ống thuỷ tinh có đường kính trong 12 mm và chiều dài tổng cộng là 300 mm, có cấu trúc thoát mao dẫn và chiều dài phần đỉnh là 100 mm và đường kính trong 50 mm $\pm$ 1 mm.

A.5.11. *Mặt kính đồng hồ*, đường kính 100 mm.

A.5.12. *Cối giã*, có chày.

A.5.13. *Giấy lọc có rãnh*, đường kính khoảng 300 mm, đã được rửa bằng dung môi.

A.5.14. *Bầu chiết (tuỳ chọn)*, được chiết sơ bộ bằng dung môi tinh khiết nhất và bảo quản trong trong hexan đựng trong bình thuỷ tinh.

Chú thích - Sử dụng bầu chiết thường dẫn đến sự có mặt các tạp chất trong dịch chiết mẫu (xuất hiện các pic nhiễu trong sắc ký khí đồ).

A.5.15. *Bông thuỷ tinh và bông cotton*, tinh khiết về thành phần hoá học.

Trước khi sử dụng, chiết bằng hỗn hợp dung môi hexan/ axeton và bảo quản trong bình chứa hexan.

A.5.16. *Phễu thuỷ tinh*, loại dài và ngắn.

A.5.17. *Phễu chiết*

A.5.18. *Bì thuỷ tinh và đĩa thuỷ tinh*, đã được rửa bằng dung môi.

A.5.19. *Cốc*, các cỡ khác nhau.

A.5.20. *Bình định mức*.

A.5.21. Dao và kẹp.**A.5.22. Bơm nước.****A.6. Quy trình chiết****A.6.1. Chiết Soxhlet**

Làm nóng bình dày tròn dung tích 500 ml (A.5.3) chứa năm viên thủy tinh (A.5.18) trong tủ sấy (A.5.1) đến 102°C trong 30 phút. Làm nguội đến nhiệt độ phòng và cân. Lặp lại quá trình sấy cho đến khi khối lượng không đổi, nghĩa là cho đến khi chênh lệch giữa kết quả của hai lần cân liên tiếp không quá 0,01 g.

Cân trực tiếp mẫu trên một mặt kính đồng hồ (A.5.11). Đối với phomat thì cắt mẫu thành từng miếng nhỏ. Chuyển mẫu vào cối giã (A.5.12) và nghiền kỹ trong hỗn hợp cát (A.4.3) và natri sunphat (A.4.2) (tỷ lệ 1 : 1 theo khối lượng) để thu được một dạng bột khô. Cũng có thể sử dụng xelit 545 (A.4.1). Lượng natri sunphat (A.4.2) và cát (A.4.3) yêu cầu phụ thuộc vào số lượng và hàm lượng nước của thực phẩm. Chuyển lượng bột thu được sang giấy lọc (A.5.13).

Lau khô cối giã, chày và mặt kính đồng hồ bằng một miếng bông cotton (A.5.15) đã được tẩm dầu nhẹ (A.4.4). Đặt miếng bông cotton vào giấy lọc đã chứa bột (A.5.13) và chuyển toàn bộ chúng (đã được gói lại) vào trong bình chứa của thiết bị chiết Soxhlet.

Sau đó cho vào bình (A.5.3) đã cân, 250 ml dầu nhẹ (A.4.4) và lượng dịch chiết mẫu sau 6 giờ dưới dòng đối lưu. Cho dung môi vào bộ cô quay (A.5.8) ở nhiệt độ khoảng 50°C và trong điều kiện áp suất giảm sử dụng bơm nước (A.5.22) và cân bình. Lặp lại quy trình như trên cho đến khi thu được khối lượng bình không đổi, nghĩa là cho đến khi chênh lệch giữa kết quả của hai lần cân liên tiếp không quá 0,01 g.

A.6.2. Chiết bằng cột

Trộn kỹ một lượng mẫu thích hợp với một lượng vừa đủ cát (A.4.3) và natri sunphat (A.4.2) (tỷ lệ 1 : 1 theo khối lượng) trong một cối giã (A.5.12) hoặc một máy xay hình cầu (A.5.9) để thu được sản phẩm dạng khô. Đối với trường hợp chiết sữa bột, hoàn nguyên hoàn toàn chúng bằng nước cất (theo tỷ lệ 9 : 1) trước khi trộn. Chuyển hỗn hợp này vào cột chiết (A.5.10) mà trước đó đã được nhồi một lớp natri sunphat dày 2 cm và được đẩy một nút nhỏ bằng bông thủy tinh (A.5.15). Rửa cột khô bằng hỗn hợp n-hexan (A.4.7) và axeton (A.4.8) (tỷ lệ 2 : 1 theo thể tích). Lượng dung môi phụ thuộc vào khối lượng và bản chất của mẫu. Thu các chất rửa giải được qua đêm và cô đặc chúng trong bộ cô quay (A.5.8) như đã mô tả trong A.6.1.

A.6.3. Phương pháp chiết theo AOAC

A.6.3.1. Lắc 100ml sữa với 100 ml metanol (A.4.5) và 1 g natri oxalat (A.4.9) khoảng 1 phút trong phễu chiết dung tích 500 ml (A.5.17). Thêm 50 ml dietyl ete (A.4.6) và lắc thêm khoảng 1 phút. Lặp lại các thao tác trên với 50 ml dầu nhẹ (A.4.4).

A.6.3.2. Cách khác, lượng mẫu và thuốc thử đã nói ở trên có thể giảm đi một nửa, thêm 50 ml hỗn hợp dietyl ete/ dầu nhẹ (tỷ lệ 1 : 1 theo thể tích). Trong trường hợp này, hỗn hợp cần được khuấy trộn mạnh trong 2 phút. Bước tiếp theo tiến hành theo cách tương tự.

A.6.3.3. Sau khi tách pha bằng ly tâm với tần số quay 1500 vòng/phút trong 5 phút, chuyển pha hữu cơ sang một phễu chiết khác (A.5.17) và chiết pha lỏng hai lần bằng các phần 50 ml hỗn hợp của dietyl ete (A.4.6) và dầu nhẹ (A.4.4) (tỷ lệ 1 : 1 theo thể tích). Rửa các pha dung môi hỗn hợp bằng 400 ml nước và loại bỏ lớp dịch lỏng. Làm khô dung dịch dung môi qua natri sunphat (A.4.2) và làm bay hơi đến khối lượng không đổi trong bình đã biết khối lượng bằng bộ cô quay (A.5.8).

A.6.4. Chiết bơ

Gia nhiệt mẫu đến khoảng 50°C và gạn qua bộ lọc nóng và khô. Hòa tan butterfat trong dung môi thích hợp.

PHỤ LỤC B

(Tham khảo)

PHÉP PHÂN TÍCH KHI CÓ MẬT BIPHENYL ĐÃ POLYCLO HOÁ (PCB)

B.1. Khái quát

Dư lượng biphenyl đã polyclo hoá (một hỗn hợp các đồng phân thu được khi clo hoá biphenyl) thường xuyên được tìm thấy trong thực phẩm, chủ yếu là thực phẩm có nguồn gốc từ động vật, cũng như trong một số vật liệu bao gói. Cho đến giai đoạn chiết và tách theo phương pháp đã đề cập, chúng thể hiện nhiều đặc điểm rất giống với các hợp chất trừ sâu clo hữu cơ. Trên sắc ký khí đồ, các pic của các hợp chất biphenyl đã polyclo hoá (PCB) có thể sẽ chồng lên trên các pic của một số hợp chất trừ sâu clo hữu cơ (đặc biệt là pic sắc ký của nhóm DDT) và điều này sẽ làm cho việc định lượng các loại thuốc trừ sâu đó khó hơn. Ví dụ, trong các trường hợp hàm lượng biphenyl đã polyclo hoá cao, 1 mg/kg biphenyl đã polyclo hoá có thể giống như 0,1 mg/kg dư lượng thuốc trừ sâu p,p' - DDT.

B.2. Tách PCB ra khỏi hợp chất trừ sâu clo hữu cơ bằng sắc ký cột hoặc bằng cách điều chế các dẫn xuất

Có vài phương pháp đã được xây dựng để tách PCB ra khỏi hợp chất trừ sâu clo hữu cơ, tách trên silicagen, trên Florisil, trên nhôm oxit/ than củi hoặc chỉ trên than củi. Các hợp chất PCB bị tách khỏi các hợp chất trừ sâu clo hữu cơ bằng cách sử dụng các dung môi có độ phân cực khác nhau. Đầu tiên các hợp chất PCB được rửa giải, sau đó là quá trình rửa giải thuốc trừ sâu clo hữu cơ bằng một dung môi phân cực hơn. Việc tách PCB ra khỏi p,p' - DDE đôi khi gặp khó khăn. Các vết dung môi phân cực hoặc sự thay đổi hoạt tính của silicagen có thể dẫn đến sự tách đồng thời một phần p,p' - DDT cùng với các hợp chất PCB.

Các hợp chất PCB và aldrin thường được rửa giải đầu tiên ra khỏi cột silicagen bằng dầu nhẹ, tiếp đến các hợp chất trừ sâu clo hữu cơ được rửa giải bằng hỗn hợp các dung môi axetonitril/hexan/diclorometan (tỷ lệ 1 : 90 : 80 theo thể tích).

Trong các trường hợp khi có mặt của p,p' -DDT gây khó khăn cho việc định lượng, thì có thể tách DDT bằng cách tạo các dẫn xuất rồi tách các sản phẩm chuyển hoá của nó. Crom trioxit (Cr_2O_3) trong axit axetic bằng oxi hoá p,p' - DDT thành p,p' - diclorobenzophenon. Các hợp chất PCB còn lại về cơ bản không bị ảnh hưởng. Xử lý dịch chiết bằng dung dịch rượu kiềm tính trước khi thực hiện sự oxi hoá bằng axit anhydrit cromic có thể khẳng định p,p' -DDT khi có mặt các hợp chất PCB. Trong quy trình này, đầu tiên p,p' -DDT được cho phản ứng với kiềm để tạo thành p,p' -DDE, sau đó hợp chất này tiếp tục bị oxi hoá thành p,p' - diclorobenzophenon.

Sử dụng phương pháp sắc ký khí cột mao dẫn có thể không cần đến việc tách bằng cột sắc ký và có tác dụng tích cực đến sự định lượng hợp chất trừ sâu clo hữu cơ khi có mặt các hợp chất PCB.

TUYÊN TẬP TIÊU CHUẨN
NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

TIÊU CHUẨN CHĂN NUÔI
PHẦN 2: SẢN PHẨM CHĂN NUÔI
IV - MẬT ONG

SẢN PHẨM ONG

Thuật ngữ và định nghĩa

Bee products
Terms and definitions

Tiêu chuẩn này qui định các thuật ngữ và định nghĩa đối với các sản phẩm ong và các sản phẩm chủ yếu được chế biến từ chúng.

Thuật ngữ (1)	Định nghĩa (2)
1. Mật ong tự nhiên - Honey	Hợp chất có vị ngọt, hương đặc trưng trạng thái từ lỏng sánh đến kết tinh do ong thợ thu từ mật hoa và dịch ngọt của cây về tổ qua luyện mật mà thành
1.1. Mật ong chín - Ripe honey	Mật ong tự nhiên được ong thợ hoàn thiện các công đoạn luyện mật và đã vớt nắp
1.2. Mật ong non - Unripe honey	Mật ong tự nhiên thu được khi chưa vớt nắp
1.3. Mật ong ly tâm - Contrifuyed honey	Mật ong thu được bằng cách ly tâm
1.4. Mật ong vắt ép - Pressed honey	Mật ong thu được bằng cách vắt ép bánh tổ chứa mật
1.5. Mật ong tinh lọc - Strained honey	Mật ong đã lọc qua thiết bị để loại bỏ các tạp chất
1.6. Mật ong bánh tổ - Comb honey	Mật ong thu được theo cách cắt và giữ nguyên mật vớt nắp trong bánh tổ
1.7. Mật ong hoa - Flower honey	Mật ong thu được do ong luyện từ mật hoa
1.7.1. Mật ong đơn hoa - Mono- flower honey	Mật ong thu được do ong luyện từ mật hoa của một loài cây hoặc chủ yếu hoa của một loài cây

Ban hành theo quyết định số 733 /QĐ ngày 31 tháng 12 năm 1990 của Ủy ban Khoa học Nhà nước

(1)	(2)
1.7.2. Mật ong đa hoa - Poly - flower honey	Mật ong thu được do ong luyến từ mật hoa của nhiều loài cây.
1.8. Mật ong lá - Extra floral honey	Mật ong thu được do ong luyến từ dịch ngọt ở các bộ phận trên cây.
1.9. Mật ong hỗn hợp - Mixed honey	Mật ong lẫn nhiều loại mật ong tự nhiên.
1.10. Mật ong kết tinh - Granulated honey	Mật ong tự nhiên đã chuyển từ trạng thái lỏng sánh sang trạng thái có tinh thể nhưng vẫn giữ nguyên thành phần và chất lượng
1.11. Mật ong nội	Mật ong thu được từ loài ong mật nội địa Apis Cerans, Apis Dorsata, Apis, Flores.
2. Phần ong tự nhiên - Pollen	Phần hoa được ong thu lượm và con người thu lại trước khi ong chui vào tổ.
2.1. Phần ong đơn hoa - Mono- flower pollen	Phần ong được ong thu lượm từ phần hoa của một vài loài cây hoặc chủ yếu của một loài cây.
2.2. Phần ong hỗn hợp - Poly - flower pollen	Phần ong được ong thu lượm từ phần hoa của nhiều loài cây
2.3. Lương ong - Bee food	Phần hoa được ong mang về tổ và chế biến thành thức ăn nuôi chúng.
2.4. Viên phần ong - Pollen tablet	Sản phẩm được chế biến từ phần ong theo dạng viên
3. Sữa chúa tự nhiên - Royal jelly	Sản phẩm có màu trắng ngà, vị chua, dạng kem mịn, mùi đặc trưng, do ong thợ tiết ra từ tuyến hạ hầu để nuôi ấu trùng ong chúa.
3.1. Sữa chúa đông khô - Dried and freezed royal jelly	Sữa chúa tự nhiên được làm mất nước bằng phương pháp đông khô.
3.2. Viên sữa chúa - Royal jelly tablet	Sản phẩm chế biến từ sữa chúa theo dạng viên.
3.3. Kem sữa chúa - Royal jelly cintment	Sản phẩm chế biến từ sữa chúa theo dạng kem.
3.4. Sữa chúa mật ong - Royal jelly in honey	Hỗn hợp của sữa chúa tự nhiên và mật ong tự nhiên.
4. Sáp ong tự nhiên - Bee wax	Sản phẩm do ong thợ tiết ra từ các tuyến sáp để xây tổ.

(1)	(2)
4.1. Sáp thô - Rough bee wax	Sáp ong chưa qua chế biến.
4.2. Sáp ong tinh lọc	Sáp ong tự nhiên đã được nấu và lọc kỹ.
4.3. Sáp ong nội	Sáp ong thu được từ các loài ong nội: <i>Apis cerana</i> , <i>Apis dorsata</i> , <i>Apis flores</i>
4.4. Sáp ong ngoại - <i>Apis mellifera</i> wax	Sáp ong thu được từ loài ong mật nhập nội <i>Apis Mellefera</i>
4.5. Sáp bánh tổ - Comb wax	Sáp ong thu được từ các bánh tổ
4.6. Sáp lưỡi mèo - Burr comb wax	Sáp ong thu được từ các bánh tổ nhỏ mới xây (còn gọi là lưỡi mèo)
4.7. Sáp cất nắp - Uncapfed wax	Sáp ong thu được do cất vít nắp
4.8. Tầng chân (nền sáp) - Lamins	Những tờ sáp có in gờ lỗ tổ ong bằng thiết bị
4.9. Chén sáp - Queen cup	Khuôn lỗ tổ ong chứa do con người sản xuất bằng sáp ong.
5. Nọc ong tự nhiên - Bee Venom	Hợp chất không màu, vị đắng, mùi hăng, đặc dễ kết tinh khi tiếp xúc với không khí, do ong thợ tiết ra từ tuyến nọc, thu được bằng thiết bị thu nọc ong.
6. Keo ong tự nhiên - Vergin propolis	Sản phẩm hỗn hợp sáp ong, nhựa dính của cây và chất thải của phần hoa khi ong tiêu hoá, có màu vàng chanh, nâu hoặc nâu đỏ thu được từ tổ ong
7. Ấu trùng ong - Bee brood	Các dạng chưa trưởng thành của các loại hình ong được lấy ra để sử dụng.

SẢN PHẨM ONG

Phương pháp lấy mẫu

*Bee products
Sampling*

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp lấy mẫu mật ong tự nhiên, phấn ong tự nhiên, sữa chúa tự nhiên.

1. **Khái niệm:** Theo TCVN 5260-90

2. **Lấy mẫu:**

2.1. *Trước khi lấy mẫu phải kiểm tra tình trạng bao gói, đối chiếu với các giấy tờ kèm theo của lô hàng.* Mẫu chỉ lấy ở những đơn vị bao gói hợp qui cách. Sau khi lấy mẫu phải lập biên bản lấy mẫu theo phụ lục.

2.2. *Số lượng các đơn vị bao gói được chỉ định lấy mẫu theo qui định trong bảng sau:*

Số lượng đơn vị bao gói có trong lô hàng đồng nhất	Số lượng đơn vị bao gói được chỉ định lấy mẫu
Từ 1 đến 5	100% số đơn vị bao gói
Từ 6 đến 50	5 đơn vị bao gói + 5% đơn vị bao gói
Từ 51 đến 100	8 đơn vị bao gói + 2% đơn vị bao gói
Trên 100	10 đơn vị bao gói + 1% đơn vị bao gói

2.3. **Lấy mẫu mật ong tự nhiên**

a) **Dụng cụ:**

- Cốc hoặc chậu thủy tinh
- Chai hoặc bình thủy tinh có nút kín
- Đũa thủy tinh
- Ống lấy mẫu bằng thủy tinh hoặc nhựa dùng cho thực phẩm

b) **Tiến hành:**

- Dùng phương pháp ngẫu nhiên để xác định số đơn vị bao gói được chỉ định lấy mẫu theo mục 2.2.
- Khuấy đều mật ong tự nhiên có trong các đơn vị bao gói. Dùng ống lấy mẫu chọc thẳng từ trên xuống tận đáy, bịt tay vào đầu trên của ống, nhấc ống lên và cho mẫu ban đầu vào cốc hoặc chậu thủy tinh.

Ban hành theo quyết định số 733 /QĐ ngày 31 tháng 12 năm 1990 của ủy ban Khoa học Nhà nước

- Gộp tất cả các mẫu ban đầu đã lấy ở các đơn vị bao gói để có mẫu chung.
- Dùng thìa thủy tinh trộn đều mẫu chung rồi lấy ra 3 mẫu trung bình. Khối lượng mỗi mẫu trung bình không nhỏ hơn 300g.

2.4. Lấy mẫu phân ong tự nhiên

a) Dụng cụ:

- Cốc hoặc chậu thủy tinh
- Chai hoặc bình thủy tinh có nút kín
- Thìa xúc mẫu bằng nhôm, sứ hoặc nhựa dùng cho thực phẩm

b) Tiến hành:

- Dùng phương pháp ngẫu nhiên để xác định số đơn vị bao gói được chỉ định lấy mẫu theo mục 2.2.
- Trộn đều phân ong tự nhiên có trong các đơn vị bao gói. Dùng thìa lấy mẫu ban đầu ở các vị trí khác nhau cho vào cốc hoặc chậu thủy tinh.
- Gộp tất cả các mẫu ban đầu đã lấy ở các đơn vị bao gói để có mẫu chung.
- Dùng thìa trộn đều mẫu chung rồi lấy ra 3 mẫu trung bình. Khối lượng mỗi mẫu trung bình không nhỏ hơn 100g.

2.5. Lấy mẫu sữa chúa tự nhiên

a) Dụng cụ:

- Cốc thủy tinh
- Chai hoặc lọ thủy tinh màu có nút kín
- Thìa lấy mẫu bằng sứ, thủy tinh hoặc nhựa dùng cho thực phẩm.

b. Tiến hành

- Dùng phương pháp ngẫu nhiên để xác định số đơn vị bao gói được chỉ định lấy mẫu theo mục 2.2.
- Dùng thìa lấy mẫu ban đầu ở các vị trí khác nhau, cho vào cốc thủy tinh
- Gộp tất cả các mẫu ban đầu đã lấy ở các đơn vị bao gói để có mẫu chung.
- Dùng thìa trộn đều mẫu chung rồi lấy ra 3 mẫu trung bình. Khối lượng mỗi mẫu trung bình không nhỏ hơn 20g.

3. Bao gói, ghi nhãn mẫu trung bình.

3.1. Mẫu trung bình được bảo quản trong các chai hoặc lọ thủy tinh nút kín, có nhãn ghi rõ.

- Tên sản phẩm;
- Tên cơ sở sản xuất;
- Ngày tháng năm lấy mẫu;
- Địa điểm lấy mẫu;
- Người lấy mẫu.

3.2. Các mẫu trung bình được sử dụng như sau:

- Một mẫu do cơ sở sản xuất lưu;
- Một mẫu do cơ quan kiểm nghiệm lưu;
- Một mẫu dùng để kiểm nghiệm.

PHỤ LỤC
BIÊN BẢN LẤY MẪU

Ngày tháng năm

Lấy mẫu sản phẩm ong

Số :

Tên sản phẩm:

Cơ sở sản xuất:

Đặc điểm lô hàng:

Khối lượng lô hàng:

Khối lượng mẫu:

Địa điểm và thời gian lấy mẫu :

Phương pháp lấy mẫu (theo TCVN....):

Người lấy mẫu:

Chữ ký của người lấy mẫu

SẢN PHẨM ONG

Phương pháp thử cảm quan

Bee products
Sensory Methods

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp thử cảm quan đối với mật ong tự nhiên, phấn ong tự nhiên, sữa chúa tự nhiên.

1. **Khái niệm:** Theo TCVN 5062 - 90
2. **Lấy mẫu:** Theo TCVN - 5261 - 90
3. **Điều kiện và dụng cụ thử:** Theo TCVN - 3215 - 79
4. **Phương pháp thử cảm quan mật ong tự nhiên**

4.1. Xác định màu sắc của mật ong bằng máy so màu LOVI bond 2000

Rót khoảng 10ml mật ong mẫu Cuvét sạch khô. Đặt Cuvét có mật ong mẫu vào đúng vị trí của máy. Cầm máy đưa ngang tầm mắt và hướng ra phía sáng để đo. Điều chỉnh thang mẫu chuẩn của máy, sao cho màu của mật ong đồng màu và màu chuẩn. Đọc kết quả thang đo và xác định màu của mật mẫu theo bảng sau:

Thang đo pfund (mm)	Phân loại	Ký hiệu quốc tế
0 - 34	Trắng trong	(W W) White Water
35 - 48	Cực trắng	(E W) Extra Water
49 - 65	Trắng	(W) White
66 - 83	Hồ phách cực trong	(ELA) Extra light amber
84 - 100	Hồ phách trong	(LA) Light amber
101 - 114	Hồ phách	(A) Amber
114	Sẫm	(D) Dark

4.2. Xác định độ trong

Rót mật ong mẫu vào ống nghiệm thủy tinh không mẫu. Đặt ống nghiệm có mẫu lên nền sáng; quan sát kỹ và nhận xét.

Ban hành theo quyết định số 733/QĐ ngày 31 tháng 12 năm 1990 của Ủy ban Khoa học Nhà nước

4.3. Xác định mùi

Rót 50ml mật ong mẫu vào cốc thủy tinh sạch, khô, dung tích 250ml, thêm 50ml nước cất ấm, khuấy đều và ngửi trực tiếp 3 lần, mỗi lần cách nhau 1 phút để xác định mùi của mật ong tự nhiên theo từng loại hoa và lá.

4.4. Xác định vị: Rót mật ong mẫu ra cốc, dùng thìa trộn đều, lấy khoảng 1 - 2ml, nếm và nhận xét.**4.5. Xác định trạng thái:**

Rót mật ong mẫu vào thìa rồi nghiêng thìa cho mật ong chảy. Quan sát tốc độ chảy, độ dính bám vào thìa, trạng thái đồng nhất của mật ong và nhận xét.

5. Phương pháp thử cảm quan phấn ong tự nhiên:**5.1. Xác định màu sắc:**

Cân khoảng 50g phấn ong tự nhiên trải thành một lớp phẳng, mỏng trên nền trắng, tiến hành dưới ánh sáng tự nhiên quan sát kỹ và nhận xét màu sắc của phấn ong tự nhiên theo từng loại.

5.2. Xác định mùi:

Cân khoảng 20- 30g phấn ong mẫu cho vào chén sứ nghiền vụn, đậy nắp, khoảng 3- 5 phút mở nắp ngửi ngay 2- 3 lần, mỗi lần cách nhau 1 phút và nhận xét.

5.3. Xác định vị:

Cân khoảng 20g mẫu phấn ong tự nhiên vào chén sứ. Dùng thìa lấy khoảng 3- 5g nếm kỹ và nhận xét.

6. Phương pháp thử cảm quan sữa chúa tự nhiên.**6.1. Xác định màu sắc:**

Cân khoảng 20g sữa chúa mẫu cho vào cốc thủy tinh không màu, sạch, khô, dung tích 50ml. Đặt cốc trên nền trắng nơi sáng, thoáng trong phòng, quan sát kỹ bằng mắt rồi nhận xét.

6.2. Xác định mùi:

Cân khoảng 10- 15g sữa chúa mẫu vào cốc thủy tinh sạch, khô, dung tích 50ml. Dùng thìa khuấy đều mẫu, ngửi 3- 4 lần, mỗi lần cách nhau 1 phút và nhận xét.

6.3. Xác định vị:

Lấy khoảng 5- 10g sữa chúa mẫu vào cốc thủy tinh sạch, khô, dung tích 50ml. Dùng thìa sứ hoặc thìa nhựa trộn đều mẫu và lấy khoảng 0,5- 1g mẫu đặt vào đầu lưỡi, ngậm khoảng 1 phút và nhận xét.

6.4. Xác định trạng thái:

Rót khoảng 5g sữa chúa đã đưa về nhiệt độ phòng vào thìa sứ rồi nghiêng thìa cho sữa chúa chảy tự nhiên, quan sát bề mặt, tốc độ chảy, độ dính bám và nhận xét.

SẢN PHẨM ONG**Phương pháp xác định chất rắn không tan trong nước***Bee products**Determination of water insoluble solid content*

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định chất rắn không tan trong nước của mật ong tự nhiên và sữa chúa tự nhiên.

1. **Khái niệm:** Theo TCVN 5260 - 90

2. **Lấy mẫu:** Theo TCVN 5261 - 90

3. **Phương pháp xác định**

3.1. **Phương pháp xác định hàm lượng chất rắn không tan trong nước của mật ong tự nhiên.**

3.1.1. Nguyên tắc: Dựa vào việc xác định khối lượng của các chất rắn không tan trong nước được giữ lại sau khi lọc và sấy khô.

3.1.2. Dụng cụ:

Tủ sấy tự ngắt có thể duy trì ở nhiệt độ $105^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ và $135^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

- Cân phân tích;
- Giấy lọc mịn;
- Đũa thuỷ tinh;
- Bình hút ẩm có silicagen;
- Bình tam giác dung tích 200 , 250, 500 ml;
- Cốc thuỷ tinh dung tích 50ml;
- Phễu lọc G4;
- Bếp điện .

3.4.3. Tiến hành thử.

Cân 20g mật ong mẫu chính xác tới 0,0001g hoà tan với 100 - 150ml nước cất đã đun nóng đến nhiệt độ 80°C , khuấy đều.

Ban hành theo quyết định số 733/QĐ ngày 31 tháng 12 năm 1990 của Ủy ban Khoa học Nhà nước

Lọc dung dịch mẫu qua giấy lọc hoặc phễu lọc đã được sấy khô và biết khối lượng. Rửa cặn bằng nước cất đun nóng nhiều lần để loại bỏ hết đường. Cho giấy lọc có cặn vào tủ sấy và sấy ở nhiệt độ $135 \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong vòng 1 giờ làm nguội trong bình hút ẩm và cân lặp lại thao tác đó cho đến khi chênh lệch khối lượng giữa 2 lần cân liên tiếp không quá 0,001g.

3.1.4. Xử lý kết quả:

Hàm lượng chất rắn không tan trong nước (X_1), tính bằng % khối lượng, theo công thức:

$$X_1 = \frac{P_1 - P_2}{m_1} \times 100$$

Trong đó : P_1 : Khối lượng giấy lọc và cặn sau khi sấy, g .

P_2 : Khối lượng giấy lọc sau khi sấy, g .

m_1 : Khối lượng mẫu, g .

Kết quả là trung bình cộng của ít nhất 2 lần thử đồng thời có sai lệch giá trị không quá 0,01%.

3.2. Phương pháp xác định hàm lượng chất rắn không tan trong nước của sữa chứa tự nhiên.

3.2.1. Nguyên tắc: Như mục 3.1.1.

3.2.2. Dụng cụ: Như quy định ở mục 3.1.2.

3.2.3. Tiến hành thử

Cân 10g sữa chứa mẫu chính xác đến 0,0001g, hoà tan trong 150 - 200 ml nước cất, khuấy đều đem lọc qua giấy lọc đã được sấy khô và biết khối lượng.

Phần cặn được rửa bằng nước cất nóng 50°C nhiều lần để loại bỏ các chất tan trong nước. cho giấy lọc có tạp chất vào tủ sấy ở nhiệt độ $105 \pm 1^{\circ}\text{C}$ và sấy trong thời gian 3-4 giờ.

Làm nguội trong bình hút ẩm và cân. Lặp lại thao tác đó cho đến khi chênh lệch khối lượng giữa 2 lần cân liên tiếp không quá 0,001g.

3.2.4. Xử lý kết quả :

Hàm lượng chất rắn không tan trong nước (X_2) tính bằng % khối lượng theo công thức:

$$X_2 = \frac{P_3 - P_4}{m_2} \times 100$$

Trong đó:

P_3 - Khối lượng giấy lọc và cặn sau khi sấy, g.

P_4 - Khối lượng giấy lọc sau khi sấy, g.

m_2 - Khối lượng mẫu thử, g.

Kết quả là trung bình cộng của ít nhất hai lần thử đồng thời có sai lệch giá trị không quá 0,01%.

MẬT ONG TỰ NHIÊN**Yêu cầu kỹ thuật***Honey
Specifications***1. Khái niệm theo TCVN 5260-90****2. Phân loại****2.1. Mật ong được phân loại theo nguồn gốc thực vật thành các loại sau :**

- Mật ong hoa
- Mật ong dịch lá
- Mật ong hỗn hợp

2.1.1. Mật ong hoa được phân loại thành mật ong đơn hoa và mật ong đa hoa tùy theo lượng mật hoa do ong khai thác chủ yếu từ một hay nhiều loại hoa...

- Mật ong đơn hoa : Mật ong hoa nhãn, mật ong hoa vải, mật ong hoa bạch đàn, mật ong hoa táo, mật ong hoa chôm chôm, mật ong hoa bạc hà, mật ong hoa cỏ lào, mật ong hoa sú vệt...
- Mật ong đa hoa: Mật ong vải nhãn, mật ong chôm chôm - café, mật ong hoa rừng...

2.2. Mật ong dịch lá: Mật ong cao su, day**2.3. Mật ong hỗn hợp: Mật ong cao su - vải - café - bạch đàn - táo - day.****3. Yêu cầu kỹ thuật.****3.1. Các chỉ tiêu cảm quan của mật ong phải đảm bảo những yêu cầu nêu trong bảng 1.****Bảng 1**

Loại mật ong	Màu sắc	Mùi vị	Trạng thái
Mật ong đơn hoa			
Mật ong hoa nhãn	Vàng nhạt	Rất đặc trưng hoa nhãn ngọt sắc	Lỏng-sánh, trong
Mật ong hoa vải	Vàng chanh	Rất đặc trưng hoa vải, ngọt nhẹ	Lỏng-sánh, trong
Mật ong hoa bạch đàn	Nâu đỏ	Đặc trưng như mùi nếp lên men, ngọt nhẹ	Lỏng-sánh, trong

Ban hành theo quyết định số 733/QĐ ngày 31 tháng 12 năm 1990 của Ủy ban Khoa học Nhà nước

Loại mật ong	Màu sắc	Mùi vị	Trạng thái
Mật ong hoa táo	Từ vàng đến nâu sẫm	Đặc trưng hoa táo, ngọt nhẹ	Lỏng-sánh, trong
Mật ong hoa chôm chôm	Từ vàng nhạt đến vàng sẫm	Thơm gần giống hoa vải, ngọt khé	Lỏng-sánh, trong
Mật ong hoa bạc hà	Vàng chanh	Rất đặc trưng hoa bạc hà, khé	Lỏng-sánh, trong hoặc kết tinh dạng mỡ
Mật ong hoa cỏ Lào	Vàng nhạt đến vàng sẫm	Thơm sắc, ngọt khé	Lỏng-sánh, trong hoặc kết tinh dạng xốp
Mật ong hoa trầm	Vàng đậm đến nâu đen	Đặc trưng của hoa trầm ngọt nhẹ	Lỏng-sánh, không trong
Mật ong hoa sú vẹt	Vàng sánh đến vàng chanh	Ít thơm ngọt nhẹ	Lỏng-sánh, trong
Mật ong đa hoa			
Mật ong vải, nhãn	Từ vàng sáng đến vàng nâu	Đặc trưng của cả hoa nhãn và hoa vải, ngọt nhẹ	Lỏng-sánh, trong
Mật ong cà phê chôm chôm	Từ vàng sáng đến vàng sẫm	Đặc trưng của hoa cà phê và chôm chôm ngọt sắc	
Mật ong hoa rừng	Từ vàng sáng đến sẫm nâu	Thơm hắc	Lỏng-sánh, trong
Mật ong dịch lá			
Mật ong cao su	Từ vàng sáng đến vàng nâu	Ít thơm, ngọt nhẹ	Lỏng-sánh, trong hoặc không trong kết tinh dạng xốp
Mật ong hỗn hợp	Từ vàng sáng đến vàng sẫm	Hỗn hợp các loại hoa, từ ngọt nhẹ đến ngọt khé	Lỏng-sánh, trong hoặc không trong kết tinh dạng mỡ hoặc dạng xốp

3.2. *Mật ong không được có dấu hiệu lên men*

3.3. *Các chỉ tiêu hoá - lý của mật ong phải đảm bảo các yêu cầu trong bảng 2.*

Bảng 2

Số TT	Tên chỉ tiêu	Mật ong hoa	Mật ong dịch lá	Mật ong hỗn hợp
1	Hàm lượng nước % khối lượng, không quá	23	21	21
2	Hàm lượng đường khử tự do, % khối lượng, không dưới	70	60	65
3	Hàm lượng đường Sacarosa, % khối lượng, không quá	5	5	5
4	Độ axit, ml NaOH 1 N/kg không quá	40	40	40
5	Chỉ số diataza, đơn vị Gote, không dưới	7	8	8
6	Hàm lượng HMF, mg/kg, không quá	20	40	30
7	Hàm lượng chất rắn không tan trong nước, % khối lượng, không quá	0,1	0,1	0,1

Chú thích: Đối với mật hoa chôm chôm, cỏ Lào, hàm lượng nước cho phép không quá 22%.

3.4. Mật ong phải đảm bảo yêu cầu vệ sinh theo TCVN 5375 - 91 và các qui định hiện hành.

4. Phương pháp thử

4.1. Lấy mẫu: Theo TCVN 5261-90

4.1.1. Đánh giá các chỉ tiêu cảm quan: Màu sắc, mùi vị, trạng thái và dạng bên ngoài theo TCVN 5262-90.

4.2. Xác định các chỉ tiêu hoá - lý theo TCVN 5263-90; 5264-90; 5266-90; 5258-90; 5269-90; 5270-90 và 5271-90.

4.3. Xác định các chỉ tiêu vệ sinh theo TCVN 5375-91.

5. Bao gói, ghi nhãn, vận chuyển, bảo quản:

5.1. Bao gói

5.1.1. Mật ong chỉ được đựng trong các bao bì làm từ các nguyên liệu sau:

- Sứ hoặc sành tráng men;
- Thủy tinh;
- Gỗ;
- Nhôm dùng cho thực phẩm, thép không gỉ hoặc sắt mạ thép không gỉ hoặc sơn vecni thực phẩm, tráng sáp ong;
- Nhựa dùng cho thực phẩm;
- Giấy có tấm chất chống thấm nước dùng cho thực phẩm.

5.1.2. Bao bì phải nguyên lành, sạch, khô, có nắp đậy kín, không bị mốc, không có mùi lạ.

5.1.3. Lượng mật ong đóng không quá 95% thể tích bao bì, nắp đậy thật kín.

5.2. Ghi nhãn

5.2.1. Nhãn trên bao bì phải ghi rõ

- Tên sản phẩm
- Loại sản phẩm
- Tên cơ sở sản xuất
- Thời gian khai thác
- Ngày tháng năm đóng gói
- Khối lượng tịnh và cả bì
- Ký hiệu tiêu chuẩn.

5.3. Vận chuyển

5.3.1. Phương tiện vận chuyển phải sạch sẽ, khô ráo, không có mùi lạ, có mui che mưa, nắng.

5.3.2. Khi vận chuyển bao bì phải được đậy kín, chèn lót, tránh đổ vỡ, dò, chảy, khi bốc dỡ phải nhẹ nhàng.

5.4. Bảo quản

5.4.1. Mật ong phải bảo quản trong kho thoáng mát, khô ráo, sạch sẽ, tránh ánh sáng trực tiếp, không có mùi lạ.

5.4.2. Mật ong phải được xếp theo từng loại, bao bì đậy kín và tránh để mật ong hút ẩm.

5.4.3. Không xếp chung mật ong với các loại sản phẩm khác có ảnh hưởng đến chất lượng mật ong.

5.4.4. Mật ong bảo quản lâu phải kiểm tra lại chất lượng trước khi xuất kho.

SỮA CHUA TỰ NHIÊN**Phương pháp xác định hàm lượng axit 10- hydro- 2- dextronic***Royal jelly**Method for determination of 10-hydroxy-2-decenoic acid*

1. **Khái niệm:** Theo TCVN 5260 - 90
2. **Lấy mẫu:** Theo TCVN 5261 - 90
3. **Phương pháp xác định**
 - 3.1. **Nguyên tắc:** Bằng phương pháp chiết diethyl ete nhiều lần nhằm loại bỏ các axit và các chất tan trong diethyl ete. Xác định lượng axit 10- hydro 2 dextronic bằng cách : dùng axit sunfuric 0,01 N chuẩn lượng natri hydroxit 0,01N dư.
 - 3.2. **Dụng cụ và hoá chất**
 - Cân phân tích;
 - Cốc thuỷ tinh dung tích 50 ,100, 200 ml;
 - Phễu thuỷ tinh;
 - Bình lắng gạn quả lê dung tích 250 ml;
 - Pipét chia vạch dung tích 1, 10 ml;
 - Bình tam giác có nút mài dung tích 250 ml;
 - Bình tia nước cát;
 - Bếp điện;
 - Giấy lọc khô;
 - Nhiệt kế đo được từ 0 - 100°C với khoảng chia độ 1°C;
 - Giấy thử pH;
 - Micro buret;
 - Giá đỡ có đế;
 - Diethyl ete, tinh khiết phân tích;
 - Natri hydroxit, dung dịch 1N;
 - Axit sunfuric, dung dịch 50%;
 - Natri hydrocacbonat; tinh khiết phân tích
 - Phênaphtalein, dung dịch 1%;

Ban hành theo quyết định số 733 /QĐ ngày 31 tháng 12 năm 1990 của ủy ban Khoa học Nhà nước

- Axit sunfuric, dung dịch 0,01N;
- Natri hydroxit, dung dịch 0,01N.

3.3. Tiến hành thử

Dùng cân phân tích cân 0,3g sữa chứa, chính xác tới 0,001 g vào cốc thuỷ tinh dung tích 50 ml. Hoà tan mẫu bằng 10 ml nước cất. Chuyển toàn bộ dung dịch sang bình lắng gạt dung tích 250 ml, lắc đều với 3 lần ête, mỗi lần 20ml dung dịch ête của 3 lần lắng gạt tập trung vào bình tam giác có nút mài, đậy kín.

Xử lý dung dịch ête bằng 3 lần natri hydroxit 1N, mỗi lần 6ml. Bỏ lớp ête, giữ lại dung dịch kiềm và nước, dùng dung dịch axit sunfuric 50% để đưa độ pH về 1. Tiếp tục dùng natri hydrocacbonat đưa dần độ pH lên 8. Trong khi cho natri hydrocacbonat nên cho dần dần, nếu tan chậm có thể đun nóng.

Cho dung dịch trên vào bình lắng gạt và xử lý 3 lần ête mỗi lần 10ml.

Dung dịch được tiếp tục axit hoá, đưa độ pH về 1 và xử lý tiếp 3 lần ête, mỗi lần 10ml.

Tập trung lớp ête lại và rửa bằng nước cất trong bình lắng gạt cho đến khi dung dịch trong bình lắng gạt trung hoà, thử bằng giấy thử pH.

Sau khi được dung dịch đã trung hoà, lọc qua giấy lọc thô có natri sunfat khan để làm khô lớp ête. Rửa lại bình lắng gạt 3 lần bằng ête, mỗi lần 3ml, cho dung dịch rửa ête đó vào phễu lọc.

Lấy lớp ête ở dưới bình hứng đem cất ở nhiệt độ 50°C trên bếp cách thuỷ để ête bay hết còn lại lớp cặn. Dùng pi-pét chia vạch cho 10ml dung dịch natri hydroxit 0,01N để hoà tan cặn. Nếu chưa tan hết đun nhẹ khoảng 1 phút, nhỏ 1 - 2 giọt phenolphthalein 1%. Đem chuẩn độ bằng axit sunfuric 0,01N cho đến khi dung dịch mất màu hồng.

3.4. Xử lý kết quả

Hàm lượng axit 10 - hydroxy 2 - dextronic (X) được tính bằng % khối lượng theo công thức:

$$X = \frac{(a - b) \times 0,00186}{m} \cdot 100$$

Trong đó :

a : Lượng natri hydroxit 0,01N dùng để hoà tan lớp cặn, ml;

b : Lượng axit sunfuric 0,01N dùng để chuẩn độ, ml;

m: Khối lượng của mẫu.

Một ml Natri hydroxit 0,01N tương đương với 0,00186 g axit 10 hydroxy 2 dextronic.

Kết quả là trung bình cộng của ít nhất 2 lần thử đồng thời có sai lệch giá trị không quá 2%.

TUYỂN TẬP
TIÊU CHUẨN NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

TẬP V

TIÊU CHUẨN CHĂN NUÔI
PHẦN 2: SẢN PHẨM CHĂN NUÔI

Chịu trách nhiệm xuất bản:

VỤ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

Cơ quan xuất bản:

TRUNG TÂM THÔNG TIN NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN.

In 500 cuốn, khổ 20,5 x 29,5 cm, tại xưởng in Trung tâm Thông tin Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn số 02 - Ngọc Hà - Ba Đình - Hà Nội. Giấy phép xuất bản số: 188/QĐ-CXB cấp ngày 30/9/2003. In xong và nộp lưu chiểu tháng 10/2003.

