

# NGHIÊN CỨU THẨM ĐỊNH CÁC CHỈ TIÊU AN TOÀN VI SINH ĐĂNG KÝ CÔNG NHẬN ISO 17025 TẠI LABO TRUNG TÂM NĂM 2019

Lê Thị Kim Chung<sup>✉</sup>, Tạ Thị Linh, Đặng Quang Tân, Nguyễn Đăng Vững,  
Vũ Thị Quý, Bùi Thị Minh Hạnh

Viện ĐT YHDP&YTCC, Trường Đại học Y Hà Nội

*Thẩm định phương pháp hay còn gọi là xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp là công việc luôn cần phải tiến hành trước khi phòng thí nghiệm đưa phương pháp đó vào sử dụng với các mục đích khác nhau, đặc biệt khi dùng cho kiểm nghiệm hoặc nghiên cứu. Labo Trung Tâm của Viện Đào tạo Y học dự phòng và Y tế công cộng (PTN) tiến hành thẩm định sáu phương pháp xác định vi sinh vật trong nước và thực phẩm có các kết quả về giới hạn phát hiện đạt yêu cầu so với ngưỡng quy chuẩn kỹ thuật quốc gia; độ đặc hiệu, độ nhạy, độ đúng đều đạt 100 % cho các phương pháp định tính. Đối với các phương pháp định lượng có các kết quả giới hạn định lượng đạt yêu cầu so với ngưỡng của quy chuẩn kỹ thuật quốc gia; độ lệch chuẩn lặp lại < 14 %, độ lệch chuẩn tái lặp < 16 % cho các phương pháp định lượng.*

**Từ khóa:** Thẩm định phương pháp; độ đặc hiệu; độ nhạy.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kiểm soát vệ sinh an toàn thực phẩm là một trong những việc quan trọng của ngành y tế dự phòng. Để thực hiện tốt nhiệm vụ của ngành an toàn thực phẩm cần phải có phương pháp chuẩn được thẩm định kỹ lưỡng. Thẩm định phương pháp là sự khẳng định bằng việc kiểm tra và cung cấp bằng chứng khách quan chứng minh rằng phương pháp đó đáp ứng được các yêu cầu đặt ra. Có các thuật ngữ khác nhau như định trị phương pháp, đánh giá phương pháp, xác nhận giá trị sử dụng phương pháp, phê duyệt phương pháp đều là cách gọi khác nhau của thẩm định phương pháp (method validation). Thẩm định phương pháp có thể xuất phát từ các phương pháp tiêu chuẩn như là các phương pháp thử theo tiêu chuẩn quốc gia, quốc tế, hiệp hội khoa học

được chấp nhận rộng rãi trên thế giới như Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN), Tổ chức Tiêu chuẩn hóa quốc tế (ISO), Hội Thử nghiệm và Vật liệu Mỹ (ASTM), Hiệp hội các nhà Hóa phân tích chính thống (AOAC)... hoặc xuất phát từ các phương pháp không tiêu chuẩn hay phương pháp nội bộ (non-standard/alternative/in-house method) như là các phương pháp do phòng thí nghiệm tự xây dựng, phương pháp theo hướng dẫn của nhà sản xuất thiết bị, phương pháp theo các tạp chí, tài liệu chuyên ngành. Theo yêu cầu của ISO 17025, phương pháp phân tích phải được thẩm định hoặc thẩm định lại khi: (1) Phương pháp áp dụng không phải là phương pháp tiêu chuẩn; (2) Phương pháp do phòng thí nghiệm tự xây dựng mới trước khi đưa vào sử dụng thành thường quy; (3) Có sự thay đổi về đối tượng áp dụng nằm ngoài đối tượng áp dụng của phương pháp đã thẩm định hoặc phương pháp tiêu chuẩn; (4) Có sự thay đổi các điều kiện thực hiện phương pháp đã được thẩm định như thiết bị phân tích với các đặc tính khác biệt, nền mẫu phân tích, người

*Tác giả liên hệ: Lê Thị Kim Chung,  
Viện ĐT YHDP & YTCC, Trường Đại học Y Hà Nội  
Email: lekimchung@hmu.edu.vn*

*Ngày nhận: 04/02/2020*

*Ngày được chấp nhận: 20/03/2020*

phân tích...)<sup>1</sup> Như vậy, kết quả của thẩm định phương pháp có thể đánh giá chất lượng, độ tin cậy của kết quả phân tích và thẩm định phương pháp là một phần không thể thiếu nếu muốn có một kết quả phân tích đáng tin cậy.

Các phương pháp xác định vi sinh vật trong nước và thực phẩm đã được chuyển đổi về các tiêu chuẩn quốc gia để xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí, Coliforms, *E.coli*, *Salmonella spp.* trong nước và thực phẩm.<sup>2-6</sup> Tuy nhiên, như theo yêu cầu (4) của ISO 17025 đã nêu ở trên, mỗi phòng thí nghiệm khi sử dụng các phương pháp này cần tiến hành thẩm định phương pháp trên hệ thống thiết bị, vật tư hóa chất của đơn vị mình để xem có phù hợp để sử dụng các phương pháp đó hay không. Các hướng dẫn về thẩm định phương pháp từ các nguồn khác nhau như tài liệu trong nước được biên soạn lại, tài liệu của tổ chức tiêu chuẩn hóa quốc tế ISO, các tài liệu hướng dẫn của Codex...<sup>7-11</sup> đã được Labo Trung tâm xem xét đưa vào áp dụng cho quá trình thẩm định các chỉ tiêu an toàn vi sinh vật trong nước và thực phẩm.<sup>2-6,12</sup> Nhằm phục vụ công tác xin công nhận phòng thí nghiệm của Viện Đào tạo Y học dự phòng và Y tế công cộng đạt tiêu chuẩn ISO 17025:2017, Labo Trung Tâm đã tiến hành thẩm định các phương pháp cụ thể sau: Đếm khuẩn lạc ở 30°C bằng kỹ thuật đổ đĩa; Định lượng Coliform bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN); Phát hiện và định lượng *E.coli* giả định bằng kỹ thuật MPN; Định lượng Coliform và *E.coli* bằng phương pháp màng lọc; Phát hiện *Salmonella* bằng kỹ thuật nuôi cấy và khuếch đại chuỗi gen PCR.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Đối tượng

Nền mẫu nghiên cứu: nền mẫu nước, thịt xay đóng hộp, rau đóng hộp, sữa tiệt trùng, bột ngũ cốc uống liền.

Chủng vi sinh vật bổ sung vào các nền mẫu phân tích bao gồm các chủng có nguồn gốc từ bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật (VTCC):

*Salmonella sp.* VTCC 12271

*Salmonella enteritica* VTCC 12270

*Escherichia coli* VTCC 12272

Các thiết bị, vật tư, môi trường nuôi cấy vi sinh.

### 2. Phương pháp

#### **Chỉ số nghiên cứu, xử lý số liệu đối với phương pháp định tính<sup>1</sup>**

**Độ nhạy SE**

Độ nhạy được tính theo các công thức:

$$SE = \frac{TP}{TP + FN} \times 100$$

**Độ đặc hiệu SP**

Độ đặc hiệu được tính theo các công thức:

$$SP = \frac{TN}{TN + FP} \times 100$$

**Độ chính xác AC**

Độ chính xác được tính theo các công thức:

$$AC = \frac{TP + TN}{N} \times 100$$

Trong đó :

TP: Dương tính đúng

FP: Dương tính giả

TN: Âm tính đúng

FN: Âm tính giả

Tổng số kết quả: N= TP + FP + FN + TN

**Giới hạn phát hiện LOD**

Giới hạn phát hiện được tính theo chương trình PODLOD calculation program version 9 (dated 2017-09-23).<sup>13</sup>

#### **Chỉ số nghiên cứu, xử lý số liệu đối với phương pháp định lượng<sup>1</sup>**

**Độ lặp lại** : thông qua độ lệch chuẩn tương đối lặp lại RSD<sub>r</sub> theo công thức

$$x_i = \frac{\log a_i + \log b_i}{2}$$

$$RSD_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(\log a_i - \log b_i) / x_i]^2}{2n}}$$

Trong đó:

$a_i, b_i$  : Các kết quả phân tích song song của cán bộ phân tích.

$x_i$ : Kết quả trung bình của hai lần thí nghiệm song song của cán bộ phân tích.

$n$ : Số kết quả phân tích song song của cùng của cán bộ phân tích.

*Độ tái lập nội bộ phòng thí nghiệm* : thông qua độ lệch chuẩn tương đối tái lập  $RSD_R$  theo công thức

$$x_i = \frac{\log a_i + \log b_i}{2}$$

$$RSD_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(\log a_i - \log b_i) / x_i]^2}{2n}}$$

Trong đó:

$a_i, b_i$ : Các kết quả phân tích song song của hai cán bộ phân tích.

$x_i$ : Kết quả trung bình của hai lần thí nghiệm song song của hai cán bộ phân tích.

$n$ : Số kết quả phân tích song song của hai cán bộ phân tích.

*Giới hạn định lượng LOQ*

Tính toán giới hạn định lượng  $LOQ = 3 \times LOD$

*Độ không đảm bảo đo U*

Tính toán độ không đảm bảo đo  $U$  theo ISO/TS 19036 :2006 thông qua độ lệch chuẩn lặp lại  $S_r$  và độ lệch chuẩn tái lập  $S_{R,10}$

***Nội dung, qui trình nghiên cứu***

***Thẩm định phương pháp đếm khuẩn lạc ở 30oC bằng kỹ thuật đổ đĩa.***<sup>2</sup>

*Nghiên cứu giới hạn phát hiện LOD*

- Nền mẫu 1 (nước): mẫu thử nhiễm chủng ở các nồng độ 2 đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU)/ ml, 10 CFU/ ml, 20 CFU/ ml, 50 CFU/ ml vào 25 ml nước vô trùng x 4 mẫu, được 4 mẫu thử nhiễm chủng có các nồng độ vi khuẩn nêu trên.

- Nền mẫu 2 (thịt xay đóng hộp): mẫu thử nhiễm chủng ở các nồng độ 20 CFU/ g, 100 CFU/ g, 200 CFU/ g, 500 CFU/ g vào 25 g mẫu x 4 mẫu, được 4 mẫu thử nhiễm chủng có các nồng độ vi khuẩn nêu trên.

- Nền mẫu 3 (rau đóng hộp): mẫu thử nhiễm chủng ở các nồng độ 20 CFU/ g, 100 CFU/ g, 200 CFU/ g, 500 CFU/ g vào 25 g mẫu x 4,

được 4 mẫu thử nhiễm chủng có các nồng độ vi khuẩn nêu trên.

*Nghiên cứu độ lặp lại, độ tái lập*

Tiến hành thí nghiệm và xử lý số liệu ở nồng độ 12500 CFU/25g/25ml, lặp lại 6 lần.

***Định lượng Coliform và Phát hiện và định lượng E.coli giả định bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất MPN.***<sup>3,4</sup>

*Nghiên cứu giới hạn phát hiện LOD*

- Nền mẫu 1 (nước): mẫu thử nhiễm chủng ở các nồng độ 4 CFU/25 ml, 5 CFU/25 ml, 10 CFU/25 ml, 20 CFU/25 ml, 200 CFU/25 ml vào 25 ml nước vô trùng được mẫu thử nhiễm chủng có các nồng độ vi khuẩn nêu trên.

- Nền mẫu 2 (thịt xay đóng hộp): mẫu thử nhiễm chủng ở các nồng độ 40 CFU/25 g, 50 CFU/25 g, 100 CFU/25 g, 200 CFU/25 g vào 25 g mẫu được mẫu thử nhiễm chủng có các nồng độ vi khuẩn nêu trên.

Nền mẫu 3 (rau đóng hộp): mẫu thử nhiễm chủng ở các nồng độ 40 CFU/25 g, 50 CFU/25 g, 100 CFU/25 g, 200 CFU/25 g vào 25 g mẫu được mẫu thử nhiễm chủng để có các nồng độ vi khuẩn nêu trên.

*Nghiên cứu độ lặp lại, độ tái lập*

Tiến hành thí nghiệm và xử lý số liệu ở nồng độ 200 CFU/ 25 g/25 ml, lặp lại 6 lần.

***Thẩm định phương pháp định lượng Coliform và E.coli bằng màng lọc.***<sup>5</sup>

*Nghiên cứu giới hạn phát hiện LOD*

Nền mẫu nước: mẫu thử nhiễm chủng ở

các nồng độ 1 CFU/100 ml, 2 CFU/100 ml, 10 CFU/100 ml, 20 CFU/100 ml vào 25 ml nước vô trùng x 3 mẫu, được 3 mẫu thử nhiễm chủng có các nồng độ vi khuẩn nêu trên.

*Nghiên cứu độ lặp lại, độ tái lập*

Tiến hành thí nghiệm và xử lý số liệu ở nồng độ 20 CFU/ 100 ml, lặp lại 6 lần.

**Thẩm định phương pháp phát hiện *Salmonella* bằng nuôi cấy<sup>6</sup> và kỹ thuật khuếch đại chuỗi gen PCR.<sup>12</sup>**

*Nghiên cứu giới hạn phát hiện LOD*

- Nền mẫu 1 (nước): mẫu thử nhiễm chủng ở các nồng độ 1 CFU/25 ml, 2 CFU/25 ml, 5 CFU/25 ml vào 25 ml nước vô trùng x 3 mẫu, được 3 mẫu thử nhiễm chủng có các nồng độ vi khuẩn nêu trên.

- Nền mẫu 2 (thịt lợn xay đóng hộp): mẫu thử nhiễm chủng ở các nồng độ 1 CFU/25 g, 2 CFU/25 g, 5 CFU/25 g vào 25 g mẫu x 3 mẫu, được 3 mẫu thử nhiễm chủng có các nồng độ vi khuẩn nêu trên.

- Nền mẫu 3 (rau đóng hộp): mẫu thử nhiễm chủng ở các nồng độ 1 CFU/25 g, 2 CFU/25 g, 5 CFU/25 g vào 25 g mẫu x 3 mẫu, được 3 mẫu thử nhiễm chủng có các nồng độ vi khuẩn nêu trên.

*Nghiên cứu độ chính xác AC, độ nhạy SE, độ đặc hiệu SP*

- Nền mẫu 1 (nước): mẫu thử nhiễm chủng ở nồng độ 5 CFU/25 ml vào 25 ml nước vô trùng x 2 mẫu, được 2 mẫu thử nhiễm chủng có các nồng độ vi khuẩn nêu trên.

- Nền mẫu 2 (thịt lợn xay đóng hộp): mẫu thử nhiễm chủng ở nồng độ 5 CFU/25 g vào 25 g mẫu x 2 mẫu, được 2 mẫu thử nhiễm chủng

có các nồng độ vi khuẩn nêu trên.

- Nền mẫu 3 (rau đóng hộp): mẫu thử nhiễm chủng ở nồng độ 5 CFU/25 g vào 25 g mẫu x 2 mẫu, được 2 mẫu thử nhiễm chủng có nồng độ vi khuẩn nêu trên.

- Nền mẫu 4 (bột ngũ cốc uống liền): mẫu thử nhiễm chủng ở các nồng độ 5 CFU/25 g vào 25 g mẫu x 2, được 2 mẫu thử nhiễm chủng có các nồng độ vi khuẩn nêu trên.

- Nền mẫu 5 (sữa tiệt trùng): mẫu thử nhiễm chủng ở nồng độ 5 CFU/25 ml vào 25 ml mẫu x 2, được 2 mẫu thử nhiễm chủng có các nồng độ vi khuẩn nêu trên.

Tương ứng với mỗi nền mẫu bổ sung chủng được chuẩn bị như trên, chuẩn bị thêm 2 mẫu không nhiễm chủng cùng điều kiện. Tiến hành phân tích 10 mẫu chứng dương và 10 mẫu chứng âm theo qui trình để tìm ra độ nhạy, độ đặc hiệu, độ đúng của phương pháp.

**2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu**

Nghiên cứu tiến hành năm 2019 tại Labo Trung tâm, Viện Đào tạo Y học dự phòng và Y tế công cộng.

**3. Đạo đức nghiên cứu:** Không áp dụng.

**III. KẾT QUẢ**

**1. Thẩm định phương pháp đếm khuẩn lạc ở 30°C bằng kỹ thuật đổ đĩa**

Độ lệch chuẩn lặp lại  $S_r$  của nền mẫu nước, thịt, rau tương ứng là 3,8 %; 2,9% và 4,0 %. Độ lệch chuẩn tái lập  $S_R$  của nền mẫu nước, thịt, rau tương ứng là 10,2 %; 8,9% và 7,7 %. Giới hạn định lượng của phương pháp là 3,7 CFU/ml/g.

**Bảng 1. Thẩm định phương pháp đếm khuẩn lạc ở 30°C bằng kỹ thuật đổ đĩa**

Thông số đánh giá	Kết quả			Tiêu chí của PTN
	Nền mẫu nước	Nền thịt	Nền rau	
$S_r$	0,038	0,029	0,040	0,14

Thông số đánh giá	Kết quả			Tiêu chí của PTN
	Nền mẫu nước	Nền thịt	Nền rau	
RSD <sub>r</sub>	0,039	0,041	0,026	< 0,05
S <sub>R</sub>	0,102	0,089	0,077	0,16
RSD <sub>R</sub>	0,059	0,051	0,044	< 0,10
LOD <sub>50%</sub> (CFU/ ml/g)	0,772	1,222	1,222	1,3
LOQ (CFU/ ml/g)	2,316	3,666	3,666	3,7
U	0,203	0,178	0,153	0,203

## 2. Thẩm định phương pháp định lượng Coliform bằng kỹ thuật MPN

**Bảng 2. Thẩm định phương pháp định lượng Coliform bằng kỹ thuật MPN**

Thông số đánh giá	Kết quả			Tiêu chí của PTN
	Nền mẫu nước	Nền thịt	Nền rau	
S <sub>r</sub>	0,033	0,037	0,042	0,14
RSD <sub>r</sub>	0,032	0,021	0,117	< 0,05
S <sub>R</sub>	0,070	0,032	0,111	0,16
RSD <sub>R</sub>	0,080	0,036	0,125	< 0,13
LOD <sub>95%</sub> (MPN/ml/g)	0,36	0,36	0,36	0,36
LOQ (MPN/ ml/g)	1,08	1,08	1,08	1,08
U	0,167	0,109	0,239	0,239

Độ lệch chuẩn lặp lại S<sub>r</sub> của nền mẫu nước, thịt, rau tương ứng là 3,3 %; 3,7 % và 4,2 %. Độ lệch chuẩn tái lặp S<sub>R</sub> của nền mẫu nước, thịt, rau tương ứng là 7,0 %; 3,2 % và 11,1 %.

Giới hạn định lượng của phương pháp là 1,08 MPN/ml/g.

## 3. Thẩm định phương pháp phát hiện và định lượng E.coli giả định bằng kỹ thuật MPN

**Bảng 3. Phát hiện và định lượng E.coli giả định bằng kỹ thuật MPN**

Thông số đánh giá	Kết quả			Tiêu chí của PTN
	Nền mẫu nước	Nền thịt	Nền rau	
S <sub>r</sub>	0,038	0,043	0,041	0,14
RSD <sub>r</sub>	0,107	0,041	0,113	< 0,12
S <sub>R</sub>	0,098	0,069	0,115	< 0,16
RSD <sub>R</sub>	0,111	0,077	0,128	< 0,15
LOD <sub>95%</sub> (MPN/ml/g)	0,36	0,36	0,36	0,36
LOQ (MPN/ ml/g)	1,08	1,08	1,08	1,08
U	0,215	0,163	0,246	0,246

Độ lệch chuẩn lặp lại  $S_r$  của nền mẫu nước, thịt, rau tương ứng là 3,8 %; 4,3 % và 4,1 %. Độ lệch chuẩn tái lập  $S_R$  của nền mẫu nước, thịt, rau tương ứng là 9,8 %; 6,9 % và 11,5 %.

Giới hạn định lượng của phương pháp là 1,08 MPN/ml/g.

#### 4. Thẩm định phương pháp định lượng Coliform và *E.coli* bằng màng lọc (Bảng 4)

**Bảng 4. Thẩm định phương pháp định lượng Coliform và *E.coli* bằng màng lọc**

Thông số đánh giá	Kết quả		Tiêu chí của PTN
	<i>E.coli</i>	Coliform	
$S_r$	0,043	0,040	0,14
RSD <sub>r</sub>	0,083	0,060	< 0,10
$S_R$	0,098	0,087	0,16
RSD <sub>R</sub>	0,076	0,066	< 0,10
LOD <sub>50%</sub> (CFU/ 100 ml)	0,3	0,3	1
LOQ (CFU/ 100 ml)	0,9	0,9	1
U	0,195	0,175	0,195

Độ lệch chuẩn lặp lại  $S_r$  của *E.coli* và coliform tương ứng là 4,3 % và 4,0 %. Độ lệch chuẩn tái lập  $S_R$  của của *E.coli* và coliform tương ứng là 9,8 % và 8,7 %. Giới hạn định lượng của phương pháp là < 1 CFU/ 100 ml.

#### 5. Thẩm định phương pháp phát hiện Salmonella bằng nuôi cấy và PCR (Bảng 5)

**Bảng 5. Thẩm định phương pháp phát hiện Salmonella bằng nuôi cấy và PCR**

TT	Thông số đánh giá	Kết quả			Tiêu chí của PTN
		Nền mẫu nước	Nền thịt	Nền rau	
1	LOD <sub>50%</sub> (CFU/ 25ml/25g)	0,47	0,45	0,35	< 1
2	AC (%)	100	100	100	> 90
3	SE (%)	100	100	100	> 90
4	SP (%)	100			> 90

Độ chính xác AC, độ nhạy SE, độ đặc hiệu SP ở các nền mẫu nước, thịt, rau đều là 100 %. Giới hạn phát hiện 50 % của ba nền mẫu đều ở mức < 1 CFU/ 25 ml/ 25 g.

## IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này cho thấy các thông số thẩm định chỉ tiêu hiếu khí của nền mẫu nước, nền mẫu thịt, nền mẫu rau bổ sung chủng vi sinh vật đích có kết quả sần sần như nhau và tiêu chí công bố của phòng thí nghiệm đạt so với các yêu cầu của tiêu chuẩn quốc gia (tiêu

chuẩn) TCVN 4884-1:2015 (ISO 4833-1:2013)<sup>2</sup> tương ứng. Các giá trị độ lệch chuẩn lặp lại, độ lệch chuẩn tương đối lặp lại của 3 nền mẫu có xu hướng nhỏ hơn độ lệch chuẩn tái lập, độ lệch chuẩn tương đối tái lập tuân theo qui luật chung về sự phù hợp. Giới hạn phát hiện và



giới hạn định lượng của phương pháp của nền mẫu thịt xay đóng hộp nhỏ hơn rất nhiều so với ngưỡng của quy chuẩn kỹ thuật quốc gia (quy chuẩn). Theo quy chuẩn, đối với nền mẫu thịt và sản phẩm chế biến từ thịt sử dụng trực tiếp không cần qua xử lý nhiệt có giới hạn cho phép đối với tổng số vi sinh vật hiếu khí là  $5 \times 10^5$  CFU/g; đối với *E.coli* là  $5 \times 10^1$  CFU/g.<sup>14</sup>

Đối với các thông số thẩm định của nền mẫu nước, nền mẫu thịt, nền mẫu rau bổ sung chủng vi sinh vật đích trong chỉ tiêu Coliform MPN có kết quả sản sản như nhau và tiêu chí công bố của phòng thí nghiệm đạt so với các yêu cầu của quy chuẩn và tiêu chuẩn tương ứng. Tuy nhiên, ngoài giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, các thông số còn lại của nền mẫu rau có xu hướng cao hơn hai nền mẫu còn lại có thể giải thích do tính chất đặc trưng của nền mẫu cũng như khả năng đồng nhất của nền mẫu rau không tối ưu bằng mẫu nước và mẫu thịt xay đóng hộp.

Các giá trị độ lệch chuẩn lặp lại, độ lệch chuẩn tương đối lặp lại của 3 nền mẫu đều nhỏ hơn độ lệch chuẩn tái lập, độ lệch chuẩn tương đối tái lập theo xu hướng, hợp lý chung. Ở nền mẫu thịt, độ lệch chuẩn lặp lại (3,7 %) lớn hơn độ lệch chuẩn tái lập (3,2 %) nhưng sự khác biệt đó nghĩ nhiều đến độ ổn định về kỹ thuật của một cán bộ phân tích hơn là qui cho khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Các thông số thẩm định của nền mẫu nước, nền mẫu thịt, nền mẫu rau bổ sung chủng vi sinh vật đích của chỉ tiêu *E.coli* MPN có kết quả gần giống với kết quả của chỉ tiêu Coliform MPN. Điều này được giải thích do kỹ thuật xác định Coliform MPN và *E.coli* MPN được tiến hành trên cùng nền mẫu, cùng chủng vi sinh vật bổ sung vào nền mẫu là *E.coli* và quá trình thí nghiệm có nhiều điểm tương đồng nhau ở các bước chuẩn bị mẫu, xử lý mẫu, các bước nuôi cấy ban đầu và bước đọc kết quả, chỉ khác

ở bước tăng sinh chọn lọc và kiểm tra tính chất sinh vật hóa học để xác định *E.coli*. Các giá trị độ lệch chuẩn lặp lại, độ lệch chuẩn tương đối lặp lại của 3 nền mẫu đều nhỏ hơn độ lệch chuẩn tái lập, độ lệch chuẩn tương đối tái lập theo xu hướng, hợp lý chung. Tuy nhiên, ngoài độ lệch chuẩn lặp lại, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, các thông số còn lại của nền mẫu rau có xu hướng cao hơn hai nền mẫu còn lại có thể giải thích do tính chất vật lý đặc trưng của nền mẫu cũng như khả năng đồng nhất của nền mẫu này không tối ưu bằng mẫu nước và mẫu thịt xay đóng hộp. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp của nền mẫu thịt xay đóng hộp nhỏ hơn rất nhiều so với ngưỡng của quy chuẩn là 0,36 MPN/g cho LOD và 1,08 MPN/g cho LOQ và các giá trị này khi chuyển đổi sang CFU/g cũng cho kết quả tương tự (Theo quy chuẩn, đối với nền mẫu thịt và sản phẩm chế biến từ thịt sử dụng trực tiếp không cần qua xử lý nhiệt có giới hạn cho phép đối với *E.coli* là  $5 \times 10^1$  CFU/g; ).<sup>14</sup>

Phương pháp màng lọc cho thấy các thông số thẩm định của nền mẫu nước bổ sung chủng vi sinh vật đích có kết quả tương đồng. Điều này được giải thích do Coliform và *E.coli* được tiến hành trên cùng nền mẫu nước, cùng chủng vi sinh vật bổ sung vào nền mẫu là *E.coli* và quá trình thí nghiệm giống nhau hoàn toàn ở các bước ban đầu là chuẩn bị mẫu, xử lý mẫu, các bước nuôi cấy ban đầu và bước đọc kết quả, chỉ khác ở bước kiểm tra tính chất sinh vật hóa học để xác định *E.coli* được bổ sung vào nền mẫu nước phân tích. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp của cả *E. Coli* và Coliform đều đạt so với yêu cầu của quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng nước sạch sử dụng cho mục đích sinh hoạt (Coliform < 3; *E.coli* < 1 CFU/ 100 ml).<sup>11</sup>

Các thông số xác nhận giá trị sử dụng cho phương pháp nuôi cấy Salmonella và phương

pháp phát hiện bằng kỹ thuật sinh học phân tử đạt yêu cầu so với quy chuẩn về xác định Salmonella trong thực phẩm. Giới hạn phát hiện của nền thịt và nền rau tốt hơn nền mẫu nước có khả năng do lượng chất dinh dưỡng ở hai nền mẫu này phong phú hơn. Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa, số liệu vẫn được coi là sản sản nhau và điều này được giải thích do nguyên liệu để tách chiết ADN cho PCR được lấy từ các khuẩn lạc điển hình của đĩa thạch nuôi cấy chọn lọc và cũng là các bước ban đầu của phương pháp xác định Salmonella truyền thống. Tuy nhiên, khi sử dụng nguyên liệu tách chiết ADN từ dịch tăng sinh chọn lọc hoặc từ dung dịch tăng sinh không chọn lọc (đệm pepton) thì khả năng phát hiện của Salmonella đã giảm đi đáng kể. Khi so với ngưỡng quy chuẩn, giới hạn phát hiện của phương pháp của các nền mẫu đều đạt yêu cầu vì có kết quả  $< 1$  CFU/25g/25ml (Theo quy chuẩn QCVN 8-3:2012/BYT, đối với nền mẫu thịt và sản phẩm chế biến từ thịt sử dụng trực tiếp không cần qua xử lý nhiệt, nền mẫu rau ăn sống có giới hạn đối với Salmonella phải là không phát hiện; quy chuẩn nước QCVN 01-1: 2018/BYT không yêu cầu về chỉ tiêu Salmonella).<sup>14</sup>

Nhìn chung, phát hiện Salmonella bằng phương pháp sinh học phân tử được rút ngắn, trả lời kết quả nhanh hơn 24 - 48 giờ so với phương pháp nuôi cấy truyền thống, giảm công sức cho người làm thí nghiệm nhưng chi phí trên mẫu cho phương pháp sinh học phân tử lại cao hơn so với phương pháp nuôi cấy truyền thống. Như vậy, phương pháp nuôi cấy truyền thống phù hợp hơn cho các đối tượng yêu cầu chi phí thấp, không cấp bách về thời gian có được kết quả phân tích còn phương pháp sinh học phân tử lại thích hợp cho các đối tượng chịu được chi phí cao hơn nhưng yêu cầu kết quả nhanh hơn.

## V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã hoàn thành nhiệm vụ thẩm định các phương pháp xin công nhận ISO 17025: 2017 cho năm 2019 về các chỉ tiêu an toàn vi sinh vật bao gồm : Đếm khuẩn lạc ở 30°C bằng kỹ thuật đổ đĩa; Định lượng Coliform bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN); Phát hiện và định lượng *E.coli* giả định bằng kỹ thuật MPN; Định lượng Coliform và *E.coli* bằng phương pháp màng lọc; Phát hiện Salmonella bằng kỹ thuật nuôi cấy và khuếch đại chuỗi gen PCR.với các thông số phù hợp theo tiêu chuẩn quốc gia và quy chuẩn kỹ thuật quốc gia hiện hành tương ứng cho lĩnh vực xét nghiệm nước và thực phẩm. Như vậy, các phương pháp đăng ký phù hợp cho việc sử dụng tại phòng thí nghiệm, trên hệ thống thiết bị máy móc, vật tư, hóa chất, môi trường và con người hiện tại, đáp ứng yêu cầu của công việc cần phải thẩm định phương pháp khi có các thay đổi liên quan đến con người, thiết bị, nền mẫu phân tích cho phòng thí nghiệm để được công nhận và duy trì ISO 17025.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Cao Sơn, Phạm Xuân Đà, Lê Thị Hồng Hào, Nguyễn Thành Trung, Phạm Gia Huệ, P.T. Nhã. *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*. Nhà Xuất bản Khoa học và Kỹ thuật 2010.
2. Tiêu chuẩn quốc gia. Phần 1: Đếm khuẩn lạc ở 30 Độ C bằng kỹ thuật đổ đĩa. *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm - Phương pháp định lượng Vi sinh vật* . Bộ Khoa học và công nghệ,TCVN4848-1:2015
3. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms - Most probable number technique, *ISO 4831*: 2006.
4. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection



and enumeration of presumptive *Escherichia coli* - Most probable number technique, *ISO 7251:2005*.

5. Water quality – Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method, *ISO 9308 - 1: 2000*.

6. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp., *ISO 6579-1:2017*.

7. Microbiology of food and animal feeding stuffs - protocol for the validation of alternative method, *ISO 16140:2003(E)*.

8. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations *ISO 7218: 2007 with amendment 1: 2013*.

9. Microbiology of the food chain - Estimation of measurement uncertainty for quantitative

determinations, *ISO 19036: 2019*.

10. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determination *ISO/TS 19036: 2006*.

11. Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods, *CAC/GL 74-2010*.

12. Trần Thị Xuân Mai, Võ Thị Thanh Phương, T.T.H.Y.v.N.V. Bé. Phát hiện nhanh *Salmonella* spp., *Salmonella enteritica* hiện diện trong thực phẩm bằng kỹ thuật PCR đa mồi (multiplex PCR), *Tạp chí Khoa học* 20b .2011: 198-208.

13. W. Wilrich. *Journal of AOAC international* 92. 2009 : 1763-1772.

14. Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với ô nhiễm vi sinh vật trong thực phẩm, QCVN 8-3 : 2012/BYT

## Summary

### STUDY ON MICROBIOLOGICAL METHODS VALIDATION FOR ACCREDITATION OF ISO 17025 AT LABO CENTER IN 2019

Microbiological Methods Validation, defined as a process to demonstrate the suitability of an analytic method, is an essential and important task to complete before applying such method for different purposes in the laboratory, especially for testing or researching. The Laboratory Center of the Institute for Preventive Medicine and Public Health (Laboratory) conducted the validation of six methods to qualify or quantify microorganisms including Coliform, *E. coli*, Total aerobic bacteria and *Salmonella* in fresh water and food matrix. For qualitative methods, the limit of detection (LOD) - in compliance with National technical regulation of microbiology contaminants in food-, the level of Specificity, Sensitivity, and Accuracy all reach 100 %. For quantitative methods, the LOD complies with National technical regulation, the repeat standard deviation is < 14 %, and the reproducible standard deviation is < 16 %.

**Keywords:** Method validation; specificity; sensitivity.