

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 11132:2015

ISO 22118:2011

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM
VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI -
PHẢN ỨNG CHUỖI POLYMERASE (PCR)
ĐỂ PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG VI SINH VẬT GÂY BỆNH
TỪ THỰC PHẨM - ĐẶC TÍNH HIỆU NĂNG**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs --
Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens --
Performance characteristics*

HÀ NỘI - 2015

Lời nói đầu

TCVN 11132:2015 hoàn toàn tương đương với ISO 22118:2011;

TCVN 11132:2015 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13
Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo
lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Các phương pháp phát hiện sinh học phân tử đã được xây dựng trong nhiều thập kỷ qua và bây giờ dùng để phát hiện các vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm. Một số phương pháp này có thể dùng để phân tích định lượng.

Hiện nay, hầu hết các phương pháp được xây dựng dựa vào phản ứng chuỗi polymerase (PCR) và PCR real-time, các nguyên tắc của phương pháp định tính và định lượng bằng sinh học phân tử khác cũng đang được xem xét.

Để so sánh các phương pháp sinh học phân tử với các phương pháp cổ điển hoặc các nguyên tắc khác, cần xây dựng các yêu cầu tối thiểu về các đặc tính hiệu năng của phương pháp.

Tiêu chuẩn này nằm trong bộ tiêu chuẩn với tên chung là *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm*:

TCVN 7682 (ISO 20838), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Yêu cầu về khuếch đại và phát hiện đối với các phương pháp định tính*

TCVN 10781 (ISO/TS 13136) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) thời gian thực – Phát hiện Escherichia coli sinh độc tố Shiga (STEC) và xác định các nhóm huyết thanh O157, O111, O26, O103 và O145*

TCVN 11131 (ISO/TS 20836), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Phép thử hiệu năng đối với máy chu trình nhiệt*

TCVN 11132 (ISO 22118) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện và định lượng vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Đặc tính hiệu năng*

TCVN 11133 (ISO 22119), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase real-time (PCR real-time) để phát hiện và định lượng vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Định nghĩa và yêu cầu chung*

TCVN 11134 (ISO 22174), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Định nghĩa và yêu cầu chung*

ISO 20837, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Requirements for sample preparation for qualitative detection [Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Yêu cầu về chuẩn bị mẫu để phát hiện định tính]*.

Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện và định lượng vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm - Đặc tính hiệu năng

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens – Performance characteristics

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các yêu cầu tối thiểu về đặc tính hiệu năng để phát hiện các trình tự axit nucleic (ADN hoặc ARN) bằng các phương pháp sinh học phân tử. Tiêu chuẩn này áp dụng để phát hiện các vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm và các chủng phân lập được bằng các phương pháp sinh học phân tử dựa vào phản ứng chuỗi polymerase (PCR).

Tiêu chuẩn này cũng có thể dùng để phát hiện các vi sinh vật gây bệnh có trong mẫu môi trường và mẫu thức ăn chăn nuôi.

CHÚ THÍCH: Các ví dụ đưa ra ở đây được dùng thường xuyên tại thời điểm xây dựng tiêu chuẩn này.

2 Tài liệu viện dẫn

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

TCVN 11134:2015 (ISO 22174:2005), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Định nghĩa và yêu cầu chung*

ISO 16140:2003, *Microbiology of food and animal feeding stuff – Protocol for the validation of alternative methods (Vi sinh trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Quy trình đánh giá các phương pháp thay thế)*.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Chất phân tích (analyte)

Thành phần phát hiện được hoặc đo được bằng phương pháp phân tích.

CHÚ THÍCH 1: Các chất phân tích có thể là vi sinh vật hoặc virus, các thành phần hoặc sản phẩm của chúng.

CHÚ THÍCH 2: Phù hợp với 3.4 của ISO 16140:2003.

3.2

Phương pháp định tính (qualitative method)

Phương pháp phân tích có thể phát hiện được sự có mặt hoặc không có mặt chất phân tích được phát hiện trực tiếp hoặc gián tiếp từ một lượng mẫu nhất định.

[ISO 16140:2003, 3.5].

3.3

Phương pháp định lượng (quantitative method)

Phương pháp phân tích có thể phát hiện số lượng chất phân tích bằng cách đo trực tiếp hoặc gián tiếp từ một lượng mẫu nhất định.

CHÚ THÍCH: Phù hợp với 3.6 của ISO 16140:2003.

3.4

Thử nghiệm độ chắc chắn (robustness testing)

<vi sinh vật trong thực phẩm> phương pháp đề nghị với những thay đổi nhỏ của quy trình hoặc yếu tố môi trường để xác định ảnh hưởng bất kỳ có trong quá trình thực hiện phương pháp.

3.5

Tính chọn lọc (selectivity)

<vi sinh vật trong thực phẩm> phép đo chọn lọc dương (phát hiện các vi khuẩn hoặc virus đích) và phép đo chọn lọc âm <không phát hiện các vi khuẩn hoặc virus không phải đích>

3.6

Độ nhạy (sensitivity)

<vi sinh vật trong thực phẩm> Phép đo số lượng nhỏ nhất các tế bào phân tích, các hạt hoặc các phân tử có thể phát hiện được trong một phản ứng riêng lẻ.

3.7

Tính đặc hiệu (specificity)

Khả năng công nhận duy nhất đích cần phát hiện, phân biệt rõ ràng với các chất và các tạp chất tương tự.

[TCVN 11134:2015 (ISO 22174:2005), 3.6.4].

3.8**Độ đúng (trueness)**

Mức độ gần nhau giữa kỳ vọng của một kết quả thử hoặc kết quả đo và giá trị thực.

[ISO 3534-2:2006^[1], 3.3.3].

3.9**Giới hạn phát hiện (detection limit/limit of detection/LOD)**

Hàm lượng tối thiểu hoặc nồng độ tối thiểu của sinh vật đích trong một lượng xác định của nền mẫu mà có thể phát hiện được trong các điều kiện thực nghiệm quy định trong phương pháp.

CHÚ THÍCH: Phù hợp với 3.1.8 của TCVN 11134:2015 (ISO 22174:2005).

3.10**Giới hạn định lượng (quantification limit/limit of quantification/LOQ)**

<vi sinh vật trong thực phẩm> lượng chất phân tích nhỏ nhất (là số lượng vi sinh vật thực tế thấp nhất) có thể đo được và định lượng được với độ đúng và độ chụm được xác định trong điều kiện thí nghiệm bằng phương pháp đánh giá xác nhận.

CHÚ THÍCH: Phù hợp với 6.2.2.2.3 của ISO 16140:2003.

3.11**Độ chụm (precision)**

Mức độ gần nhau giữa các kết quả thử/đo độc lập nhận được trong điều kiện quy định.

CHÚ THÍCH 1: Độ chụm chỉ phụ thuộc vào phân bố của sai số ngẫu nhiên chứ không liên quan đến giá trị thực hoặc giá trị quy định.

CHÚ THÍCH 2: Thước đo độ chụm thường được thể hiện bằng độ phân tán và được tính toán như độ lệch chuẩn của các kết quả thử hoặc kết quả đo. Độ chụm càng thấp thì độ lệch chuẩn càng lớn.

CHÚ THÍCH 3: Thước đo định lượng của độ chụm phụ thuộc chủ yếu vào các điều kiện quy định. Các điều kiện lặp lại và điều kiện tái lập là những tập hợp cụ thể của các điều kiện quy định.

[TCVN 8244-2:2010 (ISO 3534-2:2006)^[1], 3.3.4].

4 Đặc tính hiệu năng của các phương pháp định tính và định lượng**4.1 Yêu cầu chung**

Phương pháp phát hiện phân tử phải đáp ứng đặc tính thực hiện theo tiêu chuẩn này. Thông tin về đặc tính thực hiện của phương pháp phát hiện phân tử phải được cung cấp. Thông tin cụ thể bao gồm thử nghiệm của một phòng hoặc nhiều phòng thí nghiệm, thông tin tương ứng nhận được trong quá trình đánh giá sơ bộ phương pháp (ví dụ sự thay đổi của thông số, thuốc thử).

4.2 Phạm vi của phương pháp

Cần nêu rõ mục đích của phương pháp. Thông tin liên quan đến việc sử dụng phương pháp và các hạn chế của phương pháp phải được đề cập đến. Đặc biệt người xây dựng phương pháp cũng cần chỉ ra tiêu chí nào cần thực hiện theo tiêu chuẩn này.

4.3 Cơ sở khoa học

Tổng quan về nguyên tắc và tham khảo các ấn phẩm khoa học cần được cung cấp.

4.4 Sự chọn lọc

4.4.1 Phép thử chọn lọc dương

4.4.1.1 Yêu cầu chung

Cần cung cấp kết quả thực nghiệm từ phép thử của phương pháp với virus hoặc vi sinh vật đích. Thử nghiệm này cần bao gồm tất cả các thay đổi có liên quan hoặc các loại vi sinh vật hoặc virus theo phạm vi của phương pháp (4.2).

4.4.1.2 Các yêu cầu tối thiểu về tính đặc hiệu

Những thay đổi về các vi sinh vật hoặc virus đích cần được phát hiện với hiệu quả khuếch đại tốt, thậm chí nếu có những khác biệt về trình tự mỗi và/hoặc vị trí gắn mỗi như được đề cập trong phạm vi của phương pháp.

Nếu có thể, cần thử nghiệm 50 chủng vi sinh vật hoặc virus đích cụ thể.

4.4.2 Phép thử chọn lọc âm

4.4.2.1 Yêu cầu chung

Cần cung cấp kết quả thực nghiệm từ phép thử của phương pháp với virus hoặc vi sinh vật đích. Thử nghiệm này cần bao gồm các virus hoặc vi sinh vật có hệ thống phân loại gần nhau hoặc không gần nhau.

Phương pháp này phân biệt rõ giữa các vi sinh vật hoặc virus đích hoặc không phải đích.

4.4.2.2 Các hệ thống phép thử để phát hiện vi khuẩn

Chọn tối thiểu 30 chủng có thể làm ảnh hưởng đến vi sinh vật đích và các chủng vi sinh vật sẵn có trong từng mẫu thử. Ví dụ về các vi sinh vật thích hợp được liệt kê trong Phụ lục A.

Thử nghiệm cũng bao gồm cả virus, ví dụ nếu có sự đồng nhất trình tự của các oligonucleotide với trình tự của axit nucleic của virus.

Ít nhất 90% các chủng là vi khuẩn. Các chủng còn lại có thể là nấm men, nấm mốc hoặc virus.

Một lượng ADN có thể phát hiện rõ, ví dụ ADN của khoảng 10^6 tế bào cần được sử dụng cho thử nghiệm chọn lọc. Sự phù hợp của ADN được sử dụng để khuếch đại cần được khẳng định, ví dụ bằng hệ thống PCR thích hợp dựa trên ribosom ADN.

4.4.2.3 Hệ thống phép thử để phát hiện nấm

Chọn ít nhất 30 chủng vi sinh vật hoặc virus không phải đích.

Trong đánh giá hệ thống thử nghiệm nấm, ít nhất 90% các chủng phải là nấm. Số chủng còn lại có thể là virus hoặc vi khuẩn.

Thử nghiệm cần bao gồm cả virus, nếu có liên quan. Đây có thể là một trường hợp nếu có sự tương đồng về trình tự của các oligonucleotide với trình tự của axit nucleic của virus.

Một lượng ADN có thể phát hiện rõ, ví dụ ADN của khoảng 10^6 tế bào cần được sử dụng cho thử nghiệm chọn lọc. Sự phù hợp của ADN được sử dụng để khuếch đại cần được khẳng định, ví dụ bằng hệ thống PCR thích hợp dựa trên ribosom ADN.

4.4.2.4 Hệ thống phép thử để phát hiện virus

Trong hệ thống đánh giá thử nghiệm phát hiện virus, cần ít nhất 3 chủng virus không phải là chủng đích để thử nghiệm.

Một lượng ADN hoặc ARN có thể phát hiện rõ, ví dụ có ADN hoặc ARN của khoảng 10^6 tế bào hoặc đương lượng di truyền virus cần được sử dụng cho thử nghiệm chọn lọc. Sự phù hợp của axit nucleic được sử dụng để khuếch đại cần được khẳng định, ví dụ bằng hệ thống thử nghiệm khác.

4.5 Độ nhạy

4.5.1 Yêu cầu chung

Các kết quả thực nghiệm từ phép thử phương pháp ở các nồng độ khác nhau để kiểm tra phạm vi sử dụng của phương pháp cần có sẵn và phải được mô tả trong báo cáo đánh giá.

4.5.2 Các yêu cầu tối thiểu về độ nhạy trong các phép thử định tính

Các vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm cần thử định tính với mức độ phát hiện từ 1 tế bào đến 10 tế bào cho một phép thử đối với vi khuẩn hoặc đối với ký sinh trùng từ 10 tế bào đến 100 tế bào hoặc đương

TCVN 11132:2015

lượng di truyền virus trong một lượng chất nền thực phẩm xác định khi nghiên cứu. Nồng độ này liên quan đến lượng mẫu được dùng trước khi bắt đầu quy trình phát hiện (bao gồm bước tăng sinh).

CHÚ THÍCH: Độ nhạy của phản ứng khác với độ nhạy của phương pháp. Độ nhạy của phản ứng có thể được xác định chính xác bằng lượng axit nucleic dùng như là khuôn mẫu. Độ nhạy của phương pháp trong số những mẫu khác nhau, tùy thuộc vào hiệu quả thu hồi chất chiết theo nồng độ.

Cần tiến hành thử nghiệm trên các mẫu chứa các hệ vi sinh vật nền liên quan đến mẫu thực phẩm.

Việc đánh giá độ nhạy cần bao gồm năm loại thực phẩm khác nhau.

4.5.3 Các yêu cầu tối thiểu về độ nhạy trong các phép thử định lượng

Giới hạn trên và giới hạn dưới của dải tuyến tính của phương pháp phải được quy định.

Phải đánh giá các giới hạn này và dải tuyến tính trên các mẫu chứa các hệ vi sinh vật nền liên quan đến mẫu thực phẩm.

Việc đánh giá độ nhạy cần bao gồm năm loại thực phẩm khác nhau.

Người sử dụng phải đảm bảo rằng phương pháp được chọn bao trùm dải phát hiện đã cho của thông số đích.

4.6 Độ chắc chắn

4.6.1 Yêu cầu chung

Cần cung cấp các kết quả thu được từ thực nghiệm của phương pháp với một số dao động nhỏ chủ định về các thông số của phương pháp (ví dụ: thay đổi về nồng độ thành phần bộ kit thử, thay đổi trong thiết bị ...), nếu có sẵn.

4.6.2 Phép xác định độ chắc chắn

Có thể thực hiện phép thử liên phòng để xác định độ chắc chắn.

Các kết quả của phép thử liên phòng phải được diễn giải nghiêm ngặt. Phương pháp này có thể áp dụng nếu các kết quả của các phòng thử nghiệm khác nhau dao động không đáng kể.

4.7 Kiểm chứng phân tích

Các phép kiểm chứng phân tích phải phù hợp với các yêu cầu quy định rõ trong TCVN 11134 (ISO 22174) và ghi lại việc diễn giải kết quả. Các phép kiểm chứng này phải bao gồm kiểm chứng dương, kiểm chứng âm và kiểm chứng khuếch đại bên trong hoặc bên ngoài, các hàm lượng cụ thể của chúng, việc sử dụng và diễn giải kết quả thu được.

4.8 Độ đúng và độ chụm

Thông tin về độ đúng và độ chụm cần được cung cấp.

4.9 Thiết bị

Các quy định kỹ thuật của thiết bị có thể ảnh hưởng đến tính năng hoạt động của phương pháp. Thiết bị yêu cầu để áp dụng phương pháp cần được quy định rõ liên quan đến chuẩn bị mẫu và phân tích phân tử.

Người cung cấp phương pháp phải chỉ rõ thiết bị đã dùng để đánh giá xác nhận phương pháp.

Các phòng thử nghiệm có thể sử dụng trang thiết bị khác với thiết bị quy định trong phương pháp, nếu cho các kết quả đánh giá thực nghiệm tốt.

5 Các đặc tính hiệu năng dùng để đánh giá xác nhận

5.1 Yêu cầu chung

Phương pháp cần được đánh giá xác nhận giá trị sử dụng với cùng điều kiện như thực hiện phân tích.

Các đặc tính hiệu năng của các phương pháp sinh học phân tử phải được thiết lập theo quy trình trong ISO 16140, nếu có thể.

Nếu không áp dụng, các đặc tính hiệu năng của phương pháp phải được xác định khi áp dụng phương pháp cụ thể, nghĩa là quy trình phân tích cụ thể đối với phạm vi xác định của phương pháp (4.2).

Như một yêu cầu tối thiểu đối với việc đánh giá trong phòng thử nghiệm, phép thử phải do ít nhất hai người thực hiện. Đối với các phép phân tích độ nhạy, cần thực hiện các phép thử trên các mẫu ở mức nhiệm với các yêu cầu tối thiểu.

Các phép phân tích trong các nghiên cứu đánh giá xác nhận, bắt đầu từ việc chiết axit nucleic, cần được chạy ít nhất là lặp lại hai lần trên một mẫu.

5.2 Xác định giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng và phạm vi sử dụng đối với các phương pháp phát hiện sinh học phân tử

5.2.1 Phương pháp định tính

5.2.1.1 Yêu cầu chung

Phương pháp định tính phải được đánh giá theo đúng phương pháp sẽ được sử dụng.

TCVN 11132:2015

Phương pháp, kể cả mọi chi tiết trước khi bắt đầu các bước cô đặc hoặc làm giàu, cần có độ nhạy từ 1 cfu (đơn vị hình thành khuẩn lạc) đến 10 cfu hoặc hệ gen virus tương đương trong một lượng xác định của nền mẫu thực phẩm cần phân tích. Phương pháp không được làm tăng đáng kể số lượng dương tính giả.

Khái niệm sử dụng tỷ lệ dương tính giả và âm tính giả nhằm mô tả độ đúng và độ chụm của phương pháp phân tích định tính đã được xây dựng để phân tích vi sinh [5].

Vấn đề quan trọng trong đánh giá xác nhận loại phương pháp này là sử dụng các vật liệu thử bị nhiễm tự nhiên. Nếu không sẵn có, có thể sử dụng các mẫu bổ sung chất nhiễm bẩn, ví dụ: các mức trong một lượng xác định nền mẫu thực phẩm cần phân tích như sau:

- 0 cfu (mẫu trắng)
- 1 cfu đến 10 cfu
- 10 cfu đến 100 cfu

Thông thường, hai chủng liên quan đến nền mẫu được chọn.

Kết quả của phép thử định tính là "có" hoặc "không".

Các kết quả âm tính giả cho thấy không có mặt của chất phân tích khi thực tế chất phân tích có mặt trong mẫu; kết quả dương tính giả cho thấy có mặt chất phân tích nhưng thực tế trong mẫu lại không có. Việc tăng số lượng kết quả âm tính giả quan sát được khi lượng chất phân tích đạt đến giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp.

LOD của phương pháp định tính có thể được biểu thị là nồng độ chất phân tích cho kết quả dương tính với xác suất 0,95.

Điều này nhấn mạnh rằng tỷ lệ các kết quả âm tính giả phải nhỏ hơn hoặc bằng 0,05. Trong quá trình đánh giá xác nhận phép phân tích định tính, việc xác định số lượng dương tính giả cũng quan trọng.

Các kết quả dương tính giả và âm tính giả có thể được biểu thị theo tỷ lệ.

5.2.1.2 Tỷ lệ dương tính giả

Tỷ lệ dương tính giả là xác suất mà mẫu âm tính đã biết được phân loại thành dương tính. Tỷ lệ dương tính giả là số lượng mẫu âm tính đã biết nhưng bị phân loại nhầm chia cho tổng số mẫu âm tính (mẫu âm tính bị nhầm cộng với số lượng mẫu âm tính đúng) thu được bằng phương pháp này.

Để thuận tiện, tỷ lệ dương tính giả, p_{f+} , có thể biểu thị bằng phần trăm như sau:

$$p_{f+} = \frac{n_{f+}}{n_{f+} + n_{t+}} \times 100\%$$

Trong đó:

n_{f+} là số lượng mẫu âm tính đã biết nhưng bị phân loại thành dương tính;

n_{t+} là số lượng kết quả thử âm tính thực.

5.2.1.3 Tỷ lệ âm tính giả

Tỷ lệ âm tính giả là xác suất mà mẫu dương tính đã biết được phân loại thành âm tính. Tỷ lệ âm tính giả là số lượng mẫu dương tính đã biết nhưng bị phân loại nhầm chia cho tổng số mẫu dương tính (mẫu dương tính bị phân loại nhầm cộng với số lượng mẫu dương tính đúng) thu được bằng phương pháp này.

Để thuận tiện, tỷ lệ âm tính giả, p_{f-} , có thể biểu thị bằng phần trăm như sau:

$$p_{f-} = \frac{n_{f-}}{n_{f-} + n_{t-}} \times 100\%$$

Trong đó:

n_{f-} là số lượng mẫu dương tính đã biết nhưng bị phân loại thành âm tính;

n_{t-} là số lượng kết quả dương tính thực.

5.2.2 Phương pháp định lượng

Việc đánh giá xác nhận các phương pháp được quy định trong TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)^[2] và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)^[3] và Tài liệu tham khảo [4]. Phép xác định LOD hoặc giới hạn định lượng (LOQ) là không cần thiết để thiết lập giá trị sử dụng của phương pháp về ứng dụng đã định. Ví dụ: nếu phương pháp được sử dụng để xác định trong dải từ 1 000 cfu/g đến 100 000 cfu/g, thì không cần xác định LOD là 1 cfu/g. Cần xác định phạm vi áp dụng của phương pháp trong đánh giá xác nhận. Phương pháp chỉ sử dụng trong dải đo đã xác định.

LOQ đối với phương pháp định lượng là nồng độ chất phân tích cho kết quả dương tính với xác suất 0,9

Điều này hàm ý rằng tỷ lệ các kết quả âm tính giả là nhỏ hơn hoặc bằng 0,05.

LOQ tương ứng với nồng độ thấp nhất của dải đo sử dụng.

6 Báo cáo đánh giá xác nhận

6.1 Yêu cầu chung

Báo cáo đánh giá cần có các thông tin sau:

- a) tên của phòng thử nghiệm;
- b) ngày đánh giá;
- c) số lượng mẫu được sử dụng;
- d) số lượng và loại nền mẫu được sử dụng;
- e) kết quả của phép thử độ nhạy:
 - 1) số lượng và tên các chủng đích được sử dụng, kể cả lượng ADN hoặc ARN được dùng trong phản ứng đối với các phép thử đặc hiệu;
 - 2) số lượng và tên các vi sinh vật hoặc virus không phải đích, kể cả lượng ADN hoặc ARN được dùng trong phản ứng đối với các phép thử đặc hiệu;
 - 3) kết quả của các phép thử khả năng khuếch đại ADN hoặc ARN được dùng trong phản ứng đối với các phép thử đặc hiệu.
- f) kết quả của các phép thử độ nhạy;
- g) thông tin về độ chắc chắn của phương pháp;
- h) thông tin về các kiểm chứng phân tích được sử dụng;
- i) thông tin về thiết bị dụng cụ được sử dụng;
- j) thông tin về độ chụm và độ đúng;
- k) mọi quan sát khác có liên quan trong quá trình thực hiện nghiên cứu đánh giá xác nhận.

6.2 Phương pháp định tính

Báo cáo đánh giá xác nhận đối với các phương pháp định tính cần xem xét đến thông tin về LOD (hoặc độ nhạy của phương pháp) và độ chọn lọc. Tỷ lệ dương tính giả p_{f+} có thể được sử dụng để tính giá trị chọn lọc, tính bằng phần trăm $100 - p_{f+}$ và tỷ lệ âm tính giả p_{f-} có thể được dùng để tính giá trị độ nhạy, tính bằng phần trăm $100 - p_{f-}$.

6.3 Phương pháp định lượng

Báo cáo đánh giá xác nhận đối với các phương pháp định lượng cần xem xét đến thông tin về độ chính xác (độ đúng và độ chụm), phạm vi sử dụng và LOD và/hoặc LOQ, nếu cần.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Danh mục tối thiểu các vi sinh vật dùng cho các phép thử loại trừ để phát hiện vi khuẩn

Danh mục này bao gồm:

- *Bacillus cereus*
- *Brochothrix thermosphacta*
- *Campylobacter jejuni*
- *Citrobacter* spp.
- *Clostridium perfringens*
- *Enterobacter* spp.
- *Echerichia coli*
- *Lactobacillus* spp.
- *Listeria monocytogens*
- *Pseudomonas* spp.
- *Salmonella enterica*
- *Staphylococcus aureus*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Aspergillus* spp.
- *Sacharomyces* spp.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 8244-2:2010 (ISO 3534-2:2006), *Thống kê học – Từ vựng và ký hiệu – Phần 2: Thống kê ứng dụng*
 - [2] TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung*
 - [3] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn*
 - [4] Horwitz, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.* 1995, 67, pp. 331-343
 - [5] Feldsine, P., Abeyta, C., Andrews, W. H. AOAC International Methods Committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological Official Methods of analysis. *J. AOAC Int.* 2002, 85, pp. 1187-1200
-