

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 12365-2:2018

ISO 16140-2:2016

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG CHUỖI THỰC PHẨM –
XÁC NHẬN GIÁ TRỊ SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP –
PHẦN 2: QUY TRÌNH XÁC NHẬN GIÁ TRỊ SỬ DỤNG
PHƯƠNG PHÁP THAY THẾ SO VỚI
PHƯƠNG PHÁP CHUẨN**

*Microbiology of the food chain – Method validation –
Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods
against a reference method*

HÀ NỘI - 2018

Lời nói đầu

TCVN 12365-2:2018 hoàn toàn tương đương với ISO 16140-2:2016;

TCVN 12365-2:2018 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.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 12365 (ISO 16140) *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Xác nhận giá trị sử dụng phương pháp* gồm các tiêu chuẩn sau:

- TCVN 12365-1:2018 (ISO 16140-1:2016), Phần 1 – *Thuật ngữ và định nghĩa*
- TCVN 12365-2:2018 (ISO 16140-2:2016), Phần 2 – *Quy trình xác nhận giá trị sử dụng phương pháp thay thế so với phương pháp chuẩn*

Lời giới thiệu

Ngày nay có rất nhiều phương pháp thay thế, chủ yếu là các phương pháp độc quyền được sử dụng để đánh giá chất lượng vi sinh của nguyên liệu thô, thành phẩm và tình trạng vi sinh của quy trình sản xuất. Các phương pháp này thường nhanh hơn và dễ thực hiện hơn so với phương pháp chuẩn tương ứng. Các nhà xây dựng phương pháp, người sử dụng cuối cùng và các cơ quan chức năng cần có quy trình phổ biến đáng tin cậy để xác nhận giá trị sử dụng các phương pháp thay thế này. Dữ liệu thu được sẽ cung cấp cho người sử dụng cuối cùng về dữ liệu hiệu năng của phương pháp đưa ra, do đó, cho phép họ chọn phương pháp cụ thể. Các dữ liệu thu được cũng có thể được dùng làm cơ sở cho việc chứng nhận phương pháp bởi một tổ chức độc lập.

Tiêu chuẩn này:

- nhằm cung cấp quy trình cụ thể và hướng dẫn xác nhận giá trị sử dụng phương pháp độc quyền được sử dụng như một phương pháp nhanh và/hoặc dễ dàng thực hiện hơn so với phương pháp chuẩn tương ứng,
- cũng có thể được sử dụng để xác nhận giá trị sử dụng các phương pháp không độc quyền khác được sử dụng thay cho phương pháp chuẩn,
- được dự định là sự kế thừa của quy trình xác nhận được xuất bản trong phiên bản đầu tiên của ISO 16140 (ISO 16140:2003), và
- được xây dựng chủ yếu để xác nhận giá trị sử dụng các phương pháp có khả năng nuôi cấy vi sinh vật đích, nhưng cũng có thể áp dụng cho các phương pháp vi sinh vật không thể nuôi cấy như virus (ví dụ: Norovirus) và đơn bào ký sinh (ví dụ: *Cryptosporidium* hoặc *Giardia*). Trong những trường hợp này, một số từ ngữ cần được diễn giải để phù hợp với tình huống áp dụng cho sinh vật không thể nuôi cấy được.

Việc sử dụng tiêu chuẩn này liên quan đến chuyên môn về các lĩnh vực liên quan như vi sinh học, thiết kế thống kê, phân tích như được nêu trong các phần tương ứng. Thực tế thống kê bao gồm tổng quan về lý thuyết lấy mẫu và thiết kế các thực nghiệm, phân tích thống kê dữ liệu vi sinh (định tính và định lượng) và tổng quan về các khái niệm thống kê về lấy mẫu ngẫu nhiên, tính không đồng nhất của mẫu, tính ổn định của mẫu, thiết kế các thực nghiệm và các thành phần phương sai.

Khi tiêu chuẩn này được xem xét tiếp theo, sẽ phải tính đến tất cả các thông tin sẵn có liên quan đến mức độ tuân thủ các quy trình và lý do sai lệch đối với các sản phẩm cụ thể.

Việc hài hòa hóa các phương pháp xác nhận giá trị sử dụng không thể có ngay và đối với một số nhóm sản phẩm cụ thể thì tiêu chuẩn quốc tế và/hoặc các tiêu chuẩn quốc gia có thể đang hiện hành mà không phù hợp với tiêu chuẩn này. Hy vọng rằng khi các tiêu chuẩn đó được soát xét, sẽ được thay đổi để phù hợp với tiêu chuẩn này, nếu không thì chỉ vì các lý do kỹ thuật. Ví dụ: ISO 16297^[3] đề cập đến xác nhận giá trị sử dụng cho một đối tượng riêng (tình trạng vệ sinh của mẫu sữa tươi nguyên liệu) và sẽ tồn tại như một tiêu chuẩn xác nhận bên cạnh tiêu chuẩn này. Nếu phải xác nhận thì tiêu chuẩn cụ thể này phải được ưu tiên riêng.

**Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm –
Xác nhận giá trị sử dụng phương pháp –
Phần 2: Quy trình xác nhận giá trị sử dụng
phương pháp thay thế so với phương pháp chuẩn**

Microbiology of the food chain – Method validation –

*Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods
against a reference method*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình chung và quy trình kỹ thuật để đánh giá các phương pháp thay thế, phần lớn là phương pháp độc quyền trong phân tích vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm. Các nghiên cứu xác nhận giá trị sử dụng theo tiêu chuẩn này được dùng cho các tổ chức đánh giá, xác nhận giá trị sử dụng phương pháp.

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng để xác nhận giá trị sử dụng các phương pháp phân tích (phát hiện hoặc định lượng) vi sinh vật trong:

- các sản phẩm thực phẩm;
- các sản phẩm thức ăn chăn nuôi;
- các mẫu môi trường trong khu vực sản xuất, xử lý thực phẩm và thức ăn chăn nuôi;
- các mẫu từ giai đoạn sản xuất ban đầu.

Tiêu chuẩn này trong trường hợp cụ thể có thể áp dụng cho vi khuẩn và nấm. Một số điều trong tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho các phương pháp xác định vi sinh vật khác hoặc các chất chuyển hóa của chúng tùy theo từng trường hợp. Trong tương lai, hướng dẫn cho các sinh vật khác (ví dụ: virus và ký sinh trùng) sẽ được đưa vào trong tiêu chuẩn này hoặc được tách thành một tiêu chuẩn riêng của bộ TCVN 12365 (ISO 16140).

2 Tài liệu viện dẫn

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

TCVN 12365-1 (ISO 16140-1), *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Xác nhận giá trị sử dụng phương pháp – Phần 1: Thuật ngữ và định nghĩa*.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng các thuật ngữ và định nghĩa trong TCVN 12365-1 (ISO 16140-1).

4 Quy trình chung đối với việc xác nhận giá trị sử dụng các phương pháp thay thế

Quy trình xác nhận giá trị sử dụng bao gồm hai giai đoạn:

- nghiên cứu so sánh phương pháp của phương pháp thay thế (độc quyền) so với phương pháp chuẩn được thực hiện trong phòng thử nghiệm tổ chức;
- nghiên cứu liên phòng thử nghiệm của phương pháp thay thế (độc quyền) so với phương pháp chuẩn được thực hiện trong các phòng thử nghiệm khác nhau.

Các quy trình kỹ thuật để thực hiện nghiên cứu so sánh phương pháp và nghiên cứu liên phòng thử nghiệm được quy định tại Điều 5 và Điều 6 tùy thuộc vào bản chất của phương pháp thay thế (độc quyền) là định tính hay định lượng. Dữ liệu thu được trong một số phần của nghiên cứu xác nhận giá trị sử dụng được đánh giá bằng cách sử dụng Giới hạn chấp nhận (AL) và không đánh giá thống kê về dữ liệu. Các AL này dựa trên ý kiến của các chuyên gia và dữ liệu thu được trong các nghiên cứu xác nhận giá trị sử dụng hiện hành.

5 Phương pháp định tính – Quy trình kỹ thuật về xác nhận giá trị sử dụng

5.1 Nghiên cứu so sánh phương pháp

5.1.1 Xem xét chung

Nghiên cứu so sánh phương pháp là một phần của quá trình xác nhận giá trị sử dụng được thực hiện trong phòng thử nghiệm tổ chức. Nghiên cứu này bao gồm ba phần sau:

- nghiên cứu so sánh các kết quả của phương pháp chuẩn với kết quả của phương pháp thay thế trong các mẫu nhiễm (tự nhiên và/hoặc nhân tạo) (cũng được gọi là nghiên cứu độ đáp ứng);

- nghiên cứu so sánh để xác định mức phát hiện tương đối (RLOD) trong các mẫu gây nhiễm nhân tạo (còn gọi là nghiên cứu RLOD);
- nghiên cứu mục tiêu/loại trừ của phương pháp thay thế.

Các kết quả (trong các bảng và các phép tính) của các phần khác nhau và việc giải thích kết quả, bao gồm các kết quả khác nhau, phải được nêu trong báo cáo nghiên cứu.

Cỡ phần mẫu thử phải được nêu rõ trong phương pháp chuẩn.

5.1.2 Nghiên cứu cặp đôi hoặc không cặp đôi

Các phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế phải được thực hiện chính xác trên cùng một mẫu (cùng một phần mẫu thử) càng nhiều càng tốt. Tuy nhiên, có sự phân biệt giữa các nghiên cứu, sử dụng cùng một phần mẫu thử cho cả phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế, ví cả hai phương pháp đều có cùng bước đầu tiên trong quy trình (tăng sinh), và cần sử dụng các phần mẫu thử khác nhau cho phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế (ví dụ: do canh thang tăng sinh khác nhau). Trong trường hợp cả hai phương pháp đều sử dụng cùng một phần mẫu thử, các kết quả của hai phương pháp này sẽ có liên quan nhiều đến nhau. Ví dụ, khi mẫu không bị nhiễm, cả hai phương pháp đều cho kết quả mẫu âm tính. Do mối quan hệ này, mà dữ liệu thu được từ phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế được gọi là **cặp đôi** hoặc thích hợp. Trong tiêu chuẩn này, cụm từ "nghiên cứu cặp đôi" sẽ được sử dụng cho loại hình nghiên cứu này.

Tình huống ngược lại, cũng có thể không có bước ban đầu (tăng sinh) giống nhau cho cả phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế. Trong trường hợp này, cần sử dụng các phần mẫu thử khác nhau từ cùng lô hàng hoặc mẻ sản phẩm cho cả hai phương pháp và dữ liệu kết quả thu được gọi là **không cặp đôi** hoặc không so sánh. Trong tiêu chuẩn này, cụm từ "nghiên cứu không cặp đôi" được sử dụng cho loại hình nghiên cứu này. Việc chọn nghiên cứu **cặp đôi** hoặc **không cặp đôi** phụ thuộc vào các quy trình của phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế. Nếu có bước ban đầu trong cách tiến hành (tăng sinh) thì thiết kế nghiên cứu **cặp đôi** là bắt buộc.

Điều này mô tả nghiên cứu so sánh phương pháp nếu phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế có bước ban đầu chung trong cách tiến hành (tăng sinh) (nghiên cứu **cặp đôi**) và nếu phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế không có bước ban đầu chung (nghiên cứu **không cặp đôi**). Sự khác biệt giữa cả hai loại nghiên cứu được chỉ ra trong phần nội dung khi thích hợp.

5.1.3 Nghiên cứu độ đáp ứng

Nghiên cứu độ đáp ứng nhằm xác định chênh lệch độ đáp ứng giữa phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế. Nghiên cứu này được tiến hành sử dụng mẫu nhiễm tự nhiên và/hoặc nhân tạo. Các nhóm và các kiểu/loại khác nhau phải được kiểm tra về điều này. Giới hạn chấp nhận được xác định

về sự chênh lệch tối đa có thể chấp nhận được tùy thuộc vào loại hình nghiên cứu (cặp đôi/không cặp đôi) và số lượng nhóm được thử nghiệm.

5.1.3.1 Chọn các nhóm để thử nghiệm

Việc chọn nhóm và kiểu/loại sử dụng trong xác nhận giá trị sử dụng sẽ phụ thuộc vào loại hoặc nhóm vi sinh vật và phạm vi xác nhận.

Nếu phương pháp được áp dụng cho nhiều loại thực phẩm thì phải nghiên cứu ít nhất 5 nhóm thực phẩm. Báo cáo nghiên cứu xác nhận phải nêu rõ các nhóm thực phẩm được sử dụng trong nghiên cứu. Nếu phương pháp cần xác nhận đối với một số có hạn các nhóm thực phẩm, ví dụ: "các sản phẩm thịt ăn ngay, sản phẩm thịt cần đun lại trước khi ăn" và "sữa chế biến nhiệt và các sản phẩm sữa", thì chỉ những nhóm này được nghiên cứu. Ngoài thực phẩm, mẫu thức ăn chăn nuôi, mẫu môi trường, và mẫu giai đoạn sản xuất ban đầu có thể được đưa vào làm các nhóm bổ sung. Điều này sẽ mở rộng việc áp dụng phương pháp thay thế cho các nhóm bổ sung này.

Đối với tất cả các nhóm được chọn (thực phẩm và các sản phẩm khác), ít nhất phải nghiên cứu ba loại khác nhau cho mỗi nhóm. Phụ lục A trình bày tổng quan về các nhóm và kiểu/loại có liên quan với các vi sinh vật đặc trưng có thể có liên quan đến việc xác nhận. Phụ lục A cần được sử dụng để tạo điều kiện cho việc chọn các nhóm, kiểu/loại và các sản phẩm và vi sinh vật đặc trưng. Điều này không phải là việc chọn bắt buộc.

Khi chọn mẫu cho nghiên cứu, ưu tiên cao nhất là tìm những mẫu bị nhiễm tự nhiên. Nếu không thể có được đủ số mẫu bị nhiễm tự nhiên thì cho phép sử dụng mẫu nhiễm nhân tạo (xem Phụ lục B và Phụ lục C). Chi tiết về việc chuẩn bị mẫu đã nuôi cấy nhân tạo phải được nêu trong báo cáo nghiên cứu xác nhận. Tốt nhất là các mẫu thực phẩm thu được từ dải phân bố càng rộng càng tốt để giảm mọi sai lệch do mẫu cục bộ và mở rộng phạm vi xác nhận.

Phải bảo đảm rằng với việc chọn các kiểu/loại khác nhau, cả hệ vi khuẩn nền cao và thấp (tự nhiên), các loại ức chế (stress) khác nhau do chế biến và nguyên liệu thô (chưa chế biến) đều được đưa vào nghiên cứu.

VÍ DỤ: Để xác nhận giá trị sử dụng phương pháp phát hiện *Listeria monocytogene* và nhóm "các sản phẩm thịt ăn ngay, sản phẩm thịt xử lý nhiệt trước khi ăn", các loại sản phẩm có thể là (1) các sản phẩm thịt đã nấu chín (hệ vi khuẩn nền thấp, ức chế nhiệt), (2) các sản phẩm thịt lên men hoặc sấy khô (hệ vi khuẩn cao, ức chế pH) và (3) sản phẩm đã xử lý (hun khói) [$a_w < 0,92$] (hệ vi khuẩn nền trung bình, ức chế a_w).

Ví dụ, trong một số trường hợp, đối với phương pháp thay thế áp dụng cho nhiều loại thực phẩm, có thể kết hợp các nhóm "ăn ngay" và "nguyên liệu" từ cùng một nhóm sản phẩm. Ví dụ, các nhóm thịt nguyên liệu và thịt ăn ngay (sản phẩm) có thể được gộp vào một nhóm có ba loại chia ra các loại thực phẩm ăn ngay và nguyên liệu. Việc chọn nhóm thực phẩm (kết hợp) phải dựa trên phân tích nguy cơ.

5.1.3.2 Số lượng mẫu

Đối với mỗi nhóm cần kiểm tra, phải kiểm tra tối thiểu 60 mẫu đơn lẻ, ít nhất là ba loại với ít nhất 20 mẫu đại diện cho mỗi loại (ba loại x 20 mẫu cho mỗi loại = 60 mẫu). Phải có được phần kết quả phân tích dương tính bằng phương pháp chuẩn hoặc phương pháp thay thế (nghĩa là không phải là tất cả các mẫu đều dương tính hoặc âm tính) cho mỗi loại được kiểm tra. Trong tình huống lý tưởng, mỗi loại thử nghiệm có 10 mẫu (50 %) dương tính và 10 mẫu âm tính, nhưng nên nằm trong khoảng từ 25 % đến 75 %. Đối với mỗi nhóm, ít nhất 30 mẫu phải cho kết quả dương tính bằng phương pháp chuẩn và/hoặc phương pháp thay thế.

5.1.3.3 Kết quả của phương pháp thay thế và khẳng định

Nhiều quy trình của phương pháp thay thế gồm hai bước, bước đầu tiên là bước tăng sinh, phát hiện và bước thứ hai là khẳng định kết quả phát hiện từ bước một. Kết quả cuối cùng của phương pháp thay thế là kết quả thu được sau bước hai. Kết quả cuối cùng sẽ giống như kết quả sau khi tăng sinh và phát hiện trong trường hợp không có bước xác nhận trong quy trình phương pháp thay thế.

Kết quả (cuối cùng) của phương pháp thay thế phải khẳng định được phần nghiên cứu độ đáp ứng. Tất cả các kết quả thu được bằng phương pháp thay thế trong nghiên cứu không cặp đôi phải được khẳng định. Trong nghiên cứu cặp đôi, chỉ các kết quả dương thu được bằng phương pháp thay thế, tương ứng với kết quả của phương pháp chuẩn là âm tính, thì phải được khẳng định. Việc khẳng định này cần để xác định liệu kết quả có phải là dương tính thực hay dương tính giả. Phép thử khẳng định hoặc các phép thử phải có khả năng phục hồi và khẳng định việc nhận dạng của chúng phân lập là đích của phương pháp. Các phép thử này có thể được dựa trên quy trình khẳng định của phương pháp chuẩn, bước khẳng định của phương pháp thay thế trong trường hợp này có thể phân lập và khẳng định việc nhận dạng của chúng đích, sự kết hợp của cả hai hoặc bất kỳ quy trình nào khác có thể phân lập và khẳng định sự nhận dạng của chúng đích.

Nếu bước tăng sinh của các phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế khác nhau về số lần tăng sinh (nghĩa là: bước đầu/không chọn lọc và bước thứ hai/có chọn lọc) hoặc tổng thời gian ủ ấm, cần có cách khẳng định bổ sung cho nghiên cứu xác nhận. Cách thứ nhất phải được sử dụng với phương pháp thay thế theo đúng quy trình/hướng dẫn của nó (điều kiện kiểm tra thông thường bằng phương pháp thay thế theo quy trình đi kèm bộ thử, việc này không bao gồm các các phép thử bổ sung mà có thể được thực hiện trong quá trình nghiên cứu xác nhận). Cách thứ hai phải chuyển phần nuôi cấy tăng sinh của phương pháp thay thế sang phần tương ứng của phương pháp chuẩn sao cho giảm thiểu tổng thời gian ủ ấm của bước tăng sinh của phương pháp chuẩn được dự kiến. Kết quả của hai cách khẳng định phải được báo cáo riêng rẽ.

5.1.3.4 Tính và diễn giải độ đáp ứng

Nhìn chung, dữ liệu phải được nêu trong báo cáo để có tổng quan về các dữ liệu thô thu được. Thông tin phải được nêu rõ cho loại nhiễm (nhiễm tự nhiên hoặc gây nhiễm nhân tạo) của các mẫu được sử dụng, loại thiết kế nghiên cứu đã được sử dụng (ví dụ: nghiên cứu **cặp đôi** hoặc nghiên cứu **không cặp đôi**) và các phép thử khẳng định được sử dụng để khẳng định kết quả của phương pháp thay thế. Đối với các mẫu gây nhiễm nhân tạo, quy trình (tham khảo) sử dụng để chuẩn bị phải được quy định (xem thêm Phụ lục C).

Các kết quả thu được đối với các phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế có nguồn gốc từ cùng một mẫu, có nghĩa là từ một phần mẫu thử trong trường hợp nghiên cứu **cặp đôi** hoặc hai phần mẫu thử trong trường hợp nghiên cứu **không cặp đôi**, phải được nêu cụ thể đối với nghiên cứu **cặp đôi** theo Bảng 1 và nghiên cứu **không cặp đôi** theo Bảng 2. Bảng 3 được chuẩn bị cho các kết quả mẫu tổng hợp cho tất cả các loại của nhóm (≥ 60 mẫu) và cho mỗi loại (≥ 20 mẫu) đối với nghiên cứu **cặp đôi** và **không cặp đôi**.

Bảng 1 – So sánh và giải thích các kết quả mẫu giữa phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế cho nghiên cứu cặp đôi

Kết quả của phương pháp (chuẩn hoặc thay thế) trên mẫu			
Phương pháp chuẩn	Phương pháp thay thế (gồm mọi phép khẳng định nêu trong quy trình của phương pháp thay thế)	Khẳng định phương pháp thay thế (bằng cách bất kỳ) ^a	Diễn giải (dựa trên kết quả của phương pháp thay thế đã được khẳng định)
+	+	Không cần thiết ^b	Thống nhất dương tính (PA)
-	-	Không cần thiết ^b	Thống nhất âm tính (NA)
+	-	Không cần thiết ^b	Sai lệch âm do kết quả của phương pháp thay thế âm tính giả (ND)
-	+	+	Sai lệch dương (PD)
-	+	-	Thống nhất âm tính do kết quả của phương pháp thay thế dương tính giả (NA) ^c

^a khẳng định kết quả của phương pháp thay thế theo 5.1.3.3.

^b không cần phép thử khẳng định thêm. Kết quả của phương pháp thay thế được khẳng định giống như kết quả của phương pháp thay thế.

^c kết quả dương tính giả này (FP) phải được sử dụng để tính tỷ lệ dương tính giả.

Bảng 2 – So sánh và diễn giải các kết quả mẫu giữa các phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế đối với nghiên cứu không cặp đôi

Kết quả của phương pháp (chuẩn hoặc thay thế) trên mẫu			
Phương pháp chuẩn	Phương pháp thay thế (gồm mọi phép khẳng định nêu trong quy trình của phương pháp thay thế)	Khẳng định phương pháp thay thế (bằng cách bất kỳ) ^a	Diễn giải (dựa trên kết quả của phương pháp thay thế đã được khẳng định)
+	+	+	Thống nhất dương tính (PA)
+	+	-	Sai lệch âm do kết quả phương pháp thay thế âm tính giả (ND) ^b
-	-	-	Thống nhất âm tính (NA)
-	-	+	Thống nhất âm tính do kết quả của phương pháp thay thế dương tính giả (NA)
+	-	-	Sai lệch âm (ND)
+	-	+	Sai lệch âm do kết quả của phương pháp thay thế âm tính giả (ND)
-	+	+	Sai lệch dương (PD)
-	+	-	Thống nhất âm tính do kết quả của phương pháp thay thế dương tính giả (NA) ^b

^a khẳng định kết quả của phương pháp thay thế được thực hiện theo 5.1.3.3.

^b kết quả dương tính giả (FP) này phải được sử dụng để tính tỷ lệ dương tính giả.

Bảng 3 – Tóm tắt các kết quả thu được bằng phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế của tất cả các mẫu đối với từng nhóm

	Kết quả phương pháp chuẩn dương tính (R+)	Kết quả phương pháp chuẩn âm tính (R-)
Kết quả phương pháp thay thế dương tính (A+)	+/+ Dương tính phù hợp (PA)	-/+ Sai lệch dương (PD)
Kết quả phương pháp thay thế âm tính (A-)	+/- Sai lệch âm (ND)	-/- Âm tính phù hợp (NA)

Dựa trên dữ liệu thống kê trong Bảng 3 đối với các nhóm kết hợp theo nhóm và theo kiểu/loại, tính giá trị độ đáp ứng của phương pháp thay thế (1) và của phương pháp chuẩn (2) độ đúng tương đối (3) và tỷ số dương tính giả đối với phương pháp thay thế sau khi khẳng định thêm các kết quả (4) như sau:

$$\text{Độ đáp ứng của phương pháp thay thế: } SE_{\text{alt}} = \frac{(PA + PD)}{(PA + ND + PD)} \times 100 \% \quad (1)$$

$$\text{Độ đáp ứng của phương pháp chuẩn: } SE_{\text{ref}} = \frac{(PA + ND)}{(PA + ND + PD)} \times 100 \% \quad (2)$$

$$\text{Độ đúng tương đối: } RT = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100 \% \quad (3)$$

$$\text{Tỷ lệ dương tính giả đối với phương pháp thay thế: } FPR = \frac{FP}{NA} \times 100 \% \quad (4)$$

Trong đó: N là số lượng mẫu tổng số ($NA + PA + PD + ND$) và FP là các kết quả dương tính giả. Các phần giải thích từ viết tắt được sử dụng, xem Bảng 1 đến Bảng 3.

Các kết quả của phương pháp thay thế đã khẳng định phải được sử dụng để xác định xem có tương thích với kết quả của phương pháp chuẩn hay không.

Tình chênh lệch giữa ($ND - PD$) đối với cả nghiên cứu **cặp đôi** và **không cặp đôi** và tổng của ($ND + PD$) đối với các nghiên cứu **cặp đôi**. Kiểm tra xem chênh lệch và/hoặc tổng của PD và ND phù hợp với giới hạn chấp nhận (AL) trong Bảng 4 đối với loại nghiên cứu (**cặp đôi** và **không cặp đôi**) hay không và số lượng nhóm được sử dụng trong đánh giá.

CHÚ THÍCH: Giới hạn chấp nhận (AL) được dựa trên dữ liệu và sự thống nhất của chuyên gia. AL không dựa trên phân tích thống kê dữ liệu.

Việc diễn giải các kết quả phải được thực hiện theo từng nhóm và đối với tất cả các nhóm được sử dụng trong nghiên cứu xác nhận. Việc diễn giải các kết quả cũng phải thực hiện theo từng cách tăng sinh trong trường hợp các quy trình khác nhau được sử dụng cho các loại mẫu khác nhau. AL không đáp ứng khi giá trị quan sát được cao hơn AL . Khi AL không đáp ứng thì tiến hành điều tra (ví dụ: phân tích nguyên nhân gốc) để diễn giải các kết quả quan sát được. Dựa vào AL và thông tin bổ sung, quyết định xem phương pháp thay thế có được coi là không phù hợp với mục đích đối với nhóm hoặc các nhóm có liên quan hay không. Các lý do chấp nhận phương pháp thay thế trong trường hợp AL không đạt yêu cầu phải được nêu rõ trong báo cáo nghiên cứu.

Bảng 4 – Các thông số giới hạn chấp nhận và các giá trị đối với thiết kế nghiên cứu cặp đôi và không cặp đôi liên quan đến số lượng nhóm được sử dụng

Số lượng nhóm	Nghiên cứu cặp đôi		Nghiên cứu không cặp đôi
	(ND ^a – PD ^b)	(ND + PD)	(ND – PD)
1	3	6	3
2	4	8	4
3	5	10	5
4	5	12	5
5	5	14	5
6	6	16	6
7	6	18	7
8	6	20	7

^a ND = số lượng mẫu có kết quả sai lệch âm.
^b PD = số lượng mẫu có kết quả sai lệch dương.

CHÚ THÍCH: Thông tin về sự khác biệt quan sát được giữa các kết quả của phương pháp thay thế trước và sau khẳng định kết quả (bước 1 và bước 2) theo phương pháp thay thế cần được nêu trong báo cáo xác nhận giá trị sử dụng như thông tin bổ sung, nhưng không được sử dụng trong đánh giá tổng thể hiệu năng của phương pháp thay thế.

5.1.4 Mức phát hiện tương đối của nghiên cứu

Nghiên cứu so sánh được tiến hành để đánh giá mức phát hiện (LOD) của phương pháp thay thế so với phương pháp chuẩn. Việc đánh giá được dựa trên việc tính mức phát hiện tương đối (RLOD). Trong nghiên cứu này, sử dụng lặp lại các mẫu nhiễm nhân tạo ở ba mức nhiễm hoặc nhiều mức nhiễm hơn. Tốt nhất là các mức đã biết để tính LOD. Tuy nhiên điều này là không bắt buộc.

5.1.4.1 Chọn nhóm, số lượng mẫu và phép thử lặp lại

Đối với việc chọn nhóm và kiểu/loại, xem 5.1.3.1. Sử dụng cùng các nhóm như được chọn cho nghiên cứu độ đáp ứng (xem 5.1.3). Đối với mỗi nhóm, chọn một loại có liên quan. Để tính đại diện cao hơn cho nhóm được đánh giá, kiểu/loại này nên khác với loại dùng trong nghiên cứu độ đáp ứng (nếu có thể). Các mẫu phải được nuôi cấy nhân tạo. Các quy trình chuẩn bị mẫu nuôi cấy nhân tạo được nêu trong Phụ lục C. Mỗi kiểu/loại được nuôi cấy với một chủng khác.

Chuẩn bị tối thiểu ba mức cho mỗi loại bao gồm ít nhất một mức kiểm chứng âm, một mức thấp và cấp mức cao hơn. Tốt nhất, mức thấp là mức phát hiện lý thuyết (tức là 0,7 cfu/phần mẫu thử) và mức cao hơn là mức chỉ trên mức phát hiện lý thuyết (ví dụ: 1 cfu đến 1,5 cfu/phần mẫu thử). Ít nhất mức thấp cần có độ phục hồi từng phần theo phương pháp chuẩn (độ phục hồi từng phần ở mức thấp cần trong khoảng từ 25 % đến 75 % số mẫu được kiểm tra). Cần ước tính mức độ nhiễm (từ kiểm chứng âm). Ở

mức kiểm chứng âm, cần kiểm tra ít nhất năm mẫu lặp lại bằng cả hai phương pháp. Đối với mức thứ hai (thấp) (mức phát hiện lý thuyết), cần kiểm tra ít nhất 20 mẫu lặp lại và ở mức thứ ba (cao hơn), phải kiểm tra ít nhất 5 mẫu lặp lại theo cả hai phương pháp. Mức kiểm chứng âm không được cho kết quả dương tính. Khi thu được các kết quả dương tính, cần lập lại các thực nghiệm cho tất cả các mức.

Các kết quả thử nghiệm sai lệch dương thu được bằng phương pháp thay thế phải được khẳng định thêm (xem 5.1.3.3). RLOD phải được đánh giá sau khi khẳng định.

CHÚ THÍCH 1: Để có được sự bảo đảm tốt hơn cho việc phục hồi từng phần, có thể tạo và thử nghiệm nhiều mức nhiễm hơn.

CHÚ THÍCH 2: Cần có mức nhiễm đối với LOD của phương pháp chuẩn nếu phương pháp thay thế có LOD thấp hơn phương pháp chuẩn.

5.1.4.2 Tính và diễn giải RLOD

RLOD được xác định là tỷ số của các LOD của phương pháp thay thế và phương pháp chuẩn:

$$RLOD = \frac{LOD_{th}}{LOD_{ref}} \quad (5)$$

Đối với mỗi nhóm, ít nhất các RLOD phải được ước tính bằng cách lắp mô hình bổ sung-log-log (CLL) vào, kết hợp dữ liệu có mặt/không có mặt của cả hai phương pháp. Các mức nhiễm không cần tính toán RLOD vì chúng đã bao gồm trong mô hình kết quả các đường đồ thị xác suất phát hiện so với liều log (mức nhiễm). Mô hình thống kê và các phép tính được nêu trong Phụ lục D. Các phép tính có thể được thực hiện với các bảng Excel^{®1)} của tiêu chuẩn này. Bảng tính Excel[®] để tính các giá trị RLOD có sẵn để tải về miễn phí tại <http://standards.iso.org/iso/16140> và sau đó chọn tệp RLOD. Đối với các phép tính sử dụng bảng tính Excel[®] này, phải chọn "chưa biết nồng độ". Tính RLOD_i cho mỗi hạng mục thứ *i*. Tóm lại kết quả được nêu trong Bảng 5.

Bảng 5 – Trình bày RLOD trước và sau khi khẳng định các kết quả của phương pháp thay thế

	RLOD sử dụng các kết quả của phương pháp thay thế	RLOD sử dụng các kết quả của phương pháp thay thế đã khẳng định
Hạng mục (nhóm) (i)	RLOD _i	RLOD _i
1		
2		
...		
k		
Kết hợp		

¹⁾ Excel là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

Giới hạn chấp nhận (AL) đối với RLOD dựa trên các kết quả của phương pháp thay thế đã khẳng định quy định mức tăng tối đa LOD của phương pháp thay thế so với phương pháp chuẩn không được coi là có liên quan trong việc xem xét tính phù hợp cho mục đích của phương pháp. Do đó, giá trị AL sẽ > 1 . Cần diễn giải cho từng hạng mục.

AL đối với dữ liệu nghiên cứu cặp đôi được thiết lập ở mức 1,5, nghĩa là LOD đối với phương pháp thay thế không được cao hơn 1,5 lần LOD của phương pháp chuẩn. Giá trị LOD đối với phương pháp thay thế nhỏ hơn giá trị LOD của phương pháp chuẩn luôn được chấp nhận vì điều này có nghĩa là phương pháp thay thế có khả năng phát hiện ra mức nhiễm thấp hơn so với phương pháp chuẩn.

AL đối với dữ liệu nghiên cứu không cặp đôi ở mức 2,5, nghĩa là LOD đối với phương pháp thay thế không được cao hơn 2,5 lần LOD của phương pháp chuẩn. Giá trị LOD đối với phương pháp thay thế nhỏ hơn giá trị LOD đối với phương pháp chuẩn luôn được chấp nhận vì điều này có nghĩa là phương pháp thay thế có khả năng phát hiện ra mức nhiễm thấp hơn so với phương pháp chuẩn.

AL không được đáp ứng khi giá trị quan sát được cao hơn AL. Khi AL không đáp ứng, cần tiến hành điều tra (ví dụ: phân tích nguyên nhân gốc) để giải thích về các kết quả quan sát được. Dựa trên AL và thông tin bổ sung, quyết định xem phương pháp thay thế có được coi là không phù hợp với mục đích của nhóm hoặc kiểu/loại có liên quan cần nghiên cứu hay không. Các lý do chấp nhận phương pháp thay thế trong trường hợp AL không đáp ứng phải được nêu trong báo cáo nghiên cứu.

Ngoài việc tính RLOD, dữ liệu có thể được đánh giá sử dụng mô hình xác suất phát hiện (POD) của AOAC nêu trong Tài liệu tham khảo [14] và có trong các hướng dẫn xác nhận giá trị sử dụng của AOAC[®]. Việc đánh giá sử dụng mô hình POD có thể cung cấp thêm thông tin về sự tương đương của các phương pháp.

5.1.5 Nghiên cứu mục tiêu và loại trừ

5.1.5.1 Chọn và số lượng các chủng

Cần sử dụng một loạt các chủng. Các tiêu chí chọn các chủng thử nghiệm được nêu trong Phụ lục E. Các chủng được sử dụng cần được tính đến nguyên tắc đo của phương pháp thay thế (ví dụ: dựa vào dịch cấy, dựa trên thử nghiệm miễn dịch và phân tử). Các nguyên tắc đo khác nhau có thể cần sử dụng các bảng thử nghiệm các chủng khác nhau.

Mỗi chủng được sử dụng phải được mô tả các đặc tính sinh hóa và/hoặc huyết thanh học và/hoặc biến đổi di truyền với đầy đủ chi tiết để nhận dạng đã biết. Cần ưu tiên sử dụng các chủng phân lập từ thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, môi trường chế biến thực phẩm hoặc sản xuất ban đầu có tính đến phạm vi xác nhận. Tuy nhiên, có thể sử dụng các chủng của bộ sưu tập chủng phân lập từ bệnh viện và môi trường. Cần biết nguồn gốc của tất cả các chủng và được lưu giữ nội bộ (ví dụ: phòng thử nghiệm chuyên ngành), bộ sưu tập chủng cấy của quốc gia hoặc quốc tế có thể được sử dụng trong tương lai, nếu cần.

TCVN 12365-2:2018

Đối với phép thử mục tiêu, phải thử nghiệm ít nhất 50 mẫu thuần của vi sinh vật (đích). Với thử nghiệm mục tiêu của các phương pháp xác định *Salmonella*, phải thử nghiệm ít nhất 100 chủng thuần của các typ huyết thanh khác nhau của *Salmonella*.

Đối với phép thử loại trừ, phải thử nghiệm ít nhất 30 chủng thuần vi sinh vật (không phải đích).

Một số vi sinh vật sẽ khó hoặc không thể nuôi cấy như virus hoặc đơn bào ký sinh. Trường hợp sinh vật đích không thể nuôi cấy được, cần sử dụng các huyền phù thuần các chủng thử nghiệm bổ sung ở bước thích hợp sớm nhất của phương pháp.

CHÚ THÍCH 1: Đối với một số vi sinh vật, sẽ rất khó để thu được số lượng chủng yêu cầu đối với các phép thử mục tiêu và phép thử loại trừ. Trong những trường hợp này, các bên tham gia nghiên cứu xác nhận phải thống nhất chọn một bộ chủng thử nghiệm.

CHÚ THÍCH 2: Các hướng dẫn bảo quản và duy trì các chủng trong các bộ sưu tập (nội bộ) có thể có trong TCVN 8128 (ISO 11133)²¹.

5.1.5.2 Nuôi cấy các chủng đích (mục tiêu)

Mỗi phép thử được thực hiện một lần và chỉ với phương pháp thay thế (bao gồm cả bước khẳng định nếu được quy định trong quy trình của phương pháp thay thế). Nuôi cấy dịch pha loãng của từng chủng thử nghiệm thuần trong môi trường phát triển thích hợp. Chủng cấy này được sử dụng cho phép thử mục tiêu. Không thêm mẫu.

Chủng cấy thuần trong canh thang không chọn lọc cần được phát triển trong điều kiện tối ưu để có được mật độ tế bào cao trong pha tĩnh. Mức nồng độ của chủng cấy phải cao gấp 10 lần đến 100 lần so với mức phát hiện tối thiểu của phương pháp thay thế đang được xác nhận giá trị sử dụng và phải tiến hành tất cả các bước (tăng sinh) đã được chi tiết trong hướng dẫn của phương pháp thay thế. Nếu phương pháp thay thế có nhiều hơn một bước (tăng sinh) hướng dẫn (ví dụ: đối với các loại mẫu khác nhau), khi đó sử dụng một bước nghiêm ngặt nhất (khó khăn nhất) cho toàn bộ các chủng thử nghiệm. Khi thu được các kết quả nghi ngờ hoặc âm tính, cần lặp lại thử nghiệm với phương pháp chuẩn thì cần kiểm tra xem có thể phát hiện được với phương pháp chuẩn thích hợp hay không. Nếu kết quả là âm tính, có thể phải xem xét để lặp lại phép thử với mật hàng thực phẩm bổ sung. Nếu phương pháp thay thế có cả bước khẳng định thì các phép thử khẳng định phải bao gồm trong thử nghiệm các chủng được chọn.

5.1.5.3 Nuôi cấy các chủng không phải đích (loại trừ)

Mỗi phép thử được thực hiện một lần và chỉ với phương pháp thay thế (bao gồm cả bước khẳng định nếu được quy định trong quy trình phương pháp thay thế). Nuôi cấy dịch pha loãng của từng chủng thử nghiệm thuần trong môi trường phát triển thích hợp. Chủng cấy này được sử dụng cho phép thử loại trừ. Không thêm mẫu.

Chủng thuần cần cấy trong canh thang không chọn lọc phải được phát triển trong các điều kiện tối ưu để cho mật độ tế bào cao trong pha tĩnh. Nếu phương pháp này có bước phát triển trong môi trường chọn lọc trước bước phát hiện thì với các mục đích thử nghiệm loại trừ, cần thay môi trường chọn lọc bằng môi trường không chọn lọc. Nếu phương pháp thay thế cho kết quả nghi ngờ hoặc dương tính thì lặp lại phép thử sử dụng hướng dẫn hoàn chỉnh (tăng sinh) của phương pháp thay thế, tiến hành tăng sinh chọn lọc nếu được nêu trong hướng dẫn. Nếu phương pháp thay thế bao gồm nhiều hơn một bước tăng sinh (ví dụ: đối với nhiều loại mẫu khác nhau) thì mỗi bước cần sử dụng tất cả các chủng thử nghiệm. Ngoài ra, nên sử dụng phương pháp chuẩn để kiểm tra các chủng không thể phát hiện được bằng phương pháp chuẩn.

5.1.5.4 Biểu thị và diễn giải kết quả

Các kết quả được nêu trong Bảng 6. Phòng thử nghiệm tham gia nghiên cứu so sánh phương pháp có trách nhiệm diễn giải kết quả. Báo cáo phải nêu rõ mọi bất thường so với kết quả dự kiến.

Bảng 6 – Trình bày các kết quả của phép thử mục tiêu và loại trừ

Vi sinh vật	Phương pháp thay thế	
	Kết quả thử nghiệm	Kết quả khẳng định
Mục tiêu (chủng đích)		
1		
2		
V.v...		
Loại trừ (chủng không phải đích)		
1		
2		
V.v...		

5.2 Nghiên cứu liên phòng

5.2.1 Xem xét chung

Mục đích của nghiên cứu liên phòng thử nghiệm là xác định chênh lệch về độ đáp ứng giữa phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế khi được thử nghiệm bởi các cộng tác viên khác nhau sử dụng các mẫu giống nhau (điều kiện tái lập). Các điều kiện để tiến hành nghiên cứu liên phòng thử nghiệm cần phản ánh càng nhiều càng tốt các điều kiện thường được các phòng thử nghiệm riêng rẽ sử dụng để đạt được điều kiện tái lập. Sự khác biệt giữa các nghiên cứu cặp đôi và không cặp đôi được nêu rõ

trong văn bản. Tuy nhiên, không đưa ra các mục riêng ảnh hưởng đối với quy trình đo và phân tích dữ liệu bị hạn chế. Nghiên cứu liên phòng được phòng thử nghiệm tổ chức quản lý.

Các kết quả (các bảng và các phép tính) của các phần khác nhau và việc giải thích các kết quả, bao gồm các kết quả khác nhau, phải được nêu trong báo cáo nghiên cứu.

5.2.2 Quy trình đo

Nghiên cứu liên phòng phải tạo ra ít nhất 10 bộ dữ liệu hợp lệ từ ít nhất 10 cộng tác viên. Các cộng tác viên phải đến từ tối thiểu năm tổ chức khác nhau, nhưng tốt nhất là 10 tổ chức không bao gồm phòng thử nghiệm tổ chức. Tối đa có thể có ba bộ dữ liệu từ một tổ chức. Các kỹ thuật viên tham gia chuẩn bị mẫu để dùng trong nghiên cứu liên phòng sẽ không tham gia vào thử nghiệm các mẫu này trong nghiên cứu liên phòng.

CHÚ THÍCH: Các phòng thử nghiệm ở các địa điểm khác nhau, nhưng thuộc một công ty hoặc viện nghiên cứu, thì được chấp nhận là các tổ chức khác nhau.

Quy trình như sau:

- trong trường hợp đối với phương pháp thay thế có các quy trình khác nhau (tăng sinh), phải chọn một quy trình (tăng sinh), ví dụ: quy trình có thời gian ủ ấm ngắn nhất hoặc điều kiện chọn lọc tốt nhất. Sản phẩm đã chọn phải phù hợp với quy trình được chọn. Việc này (để chọn xem Phụ lục A) được sử dụng để chuẩn bị các mẫu thử cần có hệ vi khuẩn nền tự nhiên;
- mẫu thử này phải được cấy vi sinh vật đích. Quy trình cấy mẫu phải phù hợp với sản phẩm đã chọn. Các mẫu thử phải do phòng thử nghiệm tổ chức chuẩn bị để đảm bảo sự đồng nhất giữa các mẫu sử dụng các quy trình chuẩn bị có trong Phụ lục B và Phụ lục C;
- phải sử dụng ít nhất 3 mức nhiễm khác nhau: kiểm chứng âm (L_0) và hai mức (L_1 và L_2). Ít nhất một trong số này sẽ cho các kết quả dương tính từng phần. Mức nhiễm cần thiết để thu được độ phục hồi từng phần phải dựa trên số liệu nghiên cứu RLOD của phương pháp chuẩn trong nghiên cứu so sánh phương pháp. Theo lý thuyết, mức độ nhiễm trung bình 1 cfu/mẫu là đủ để thu được độ phục hồi từng phần;
- mỗi cộng tác viên phân tích ít nhất 8 mẫu mù lặp lại ở mỗi mức nhiễm theo cả hai phương pháp, vì vậy tổng cộng tối thiểu là 48 kết quả (8 lần lặp lại x 3 mức x hai phương pháp) cho mỗi cộng tác viên;
- đối với các phép thử cho kết quả cặp đôi [kết quả cặp đôi xảy ra khi bước ban đầu (tăng sinh) là giống nhau đối với phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế], cần có một mẫu để thu được một kết quả đối với phương pháp thay thế và phương pháp chuẩn. Đối với phép thử cho kết quả không cặp đôi [kết quả không cặp đôi xảy ra khi các phương pháp thay thế và phương pháp chuẩn bắt đầu từ các bước ban đầu (tăng sinh) khác nhau], cần đến các phần mẫu thử khác nhau từ cùng một mẫu. Một phần mẫu thử được phân tích bằng phương pháp thay thế và một phần mẫu thử khác được phân tích bằng phương pháp chuẩn;

– dữ liệu được báo cáo trong hai bảng, bảng đầu tiên cho các kết quả thu được bằng phương pháp chuẩn và bảng thứ hai cho các kết quả thu được bằng phương pháp thay thế trước và sau khi khẳng định kết quả. Nếu kết quả của phương pháp thay thế và phương pháp chuẩn thu được từ cùng một canh thang (tăng sinh) ban đầu (dữ liệu cặp đôi) thì việc khẳng định phương pháp chuẩn cũng khẳng định được phương pháp thay thế. Trong các trường hợp phương pháp chuẩn cho kết quả âm tính và phương pháp thay thế cho kết quả dương tính, cần khẳng định lại kết quả dương tính. Nếu kết quả của phương pháp thay thế và phương pháp chuẩn thu được từ các bước (tăng sinh) khác nhau (không cặp đôi) thì tất cả các kết quả thu được bằng phương pháp thay thế phải khẳng định. Quy trình khẳng định phải bao gồm trong quy trình nghiên cứu và phải có thể thu hồi và khẳng định việc nhận biết của chúng phân lập đúng là đích của phương pháp;

– phòng thử nghiệm tổ chức phải giữ lại canh thang, các đĩa môi trường và/hoặc các chủng phân lập trong một khoảng thời gian nhất định để có thể khẳng định kết quả thu được của cộng tác viên, nếu cần;

– mỗi cộng tác viên phải thực hiện phân tích mẫu vào đúng thời gian quy định;

– trong cả hai trường hợp, việc kết hợp "số mức nhiễm/số phân tích lặp lại/số cộng tác viên không hợp lệ" sẽ được chọn sao cho thu được ít nhất 480 kết quả (240 cho mỗi phương pháp) sử dụng để tính toán cho mỗi phương pháp.

Phòng thử nghiệm tổ chức sử dụng tất cả các dữ liệu ghi lại để xác định kết quả phù hợp sử dụng trong việc phân tích dữ liệu. Phòng thử nghiệm tổ chức phải kiểm tra dữ liệu thô và thông tin cần thiết khác trong bảng dữ liệu để đảm bảo rằng tất cả các cộng tác viên đã thực hiện phân tích bằng phương pháp thay thế và phương pháp chuẩn như đã lập thành văn bản. Khi có bằng chứng cho thấy kết quả có thể đạt được trong các điều kiện không thích hợp và/hoặc các phương pháp không được tuân thủ nghiêm ngặt thì tất cả hoặc tất cả các kết quả từ cộng tác viên đều bị loại ra để phân tích tiếp.

Khi nghiên cứu liên phòng thử nghiệm kết thúc, tất cả các thông tin về bảng dữ liệu và kết quả phải được chuyển đến phòng thử nghiệm tổ chức và kiểm tra như sau:

– bỏ qua dữ liệu của các cộng tác viên nếu điều kiện và thời gian vận chuyển nằm ngoài giới hạn cho phép (các giới hạn về thời gian và nhiệt độ vận chuyển phải được quy định trước khi vận chuyển mẫu);

– bỏ qua dữ liệu của các cộng tác viên nhận được mẫu/bộ thử nghiệm v.v... đã bị hư hỏng trong quá trình vận chuyển;

– bỏ qua dữ liệu của các cộng tác viên sử dụng công thức môi trường nuôi cấy không phù hợp với phương pháp (chuẩn);

– bỏ qua dữ liệu của các cộng tác viên nếu các câu hỏi cho thấy rằng phòng thử nghiệm đã thực hiện lệch khỏi quy trình chuẩn hoặc các điều kiện thử nghiệm quyết định.

5.2.3 Tính toán và tóm tắt dữ liệu

Kết quả thu được từ các cộng tác viên độc lập trong nghiên cứu liên phòng thử nghiệm được tóm tắt trong Bảng 7 và trong Bảng 8.

Bảng 7 – Kết quả dương tính bằng phương pháp chuẩn

Cộng tác viên	Mức nhiệm		
	L_0	L_1	L_2
Cộng tác viên số 1	/B ^a	/B ^b	/B ^c
Cộng tác viên số 2	/B	/B	/B
Cộng tác viên số 3	/B	/B	/B
v.v...	/B	/B	/B
Tổng cộng	P_0	P_1	P_2

^a số lượng kết quả của phương pháp chuẩn dương tính ở mức 0.
^b số lượng kết quả của phương pháp chuẩn dương tính ở mức 1.
^c số lượng kết quả của phương pháp chuẩn dương tính ở mức 2.

Bảng 8 – Các kết quả dương tính (trước và sau khẳng định) bằng phương pháp thay thế

Cộng tác viên	Mức nhiệm					
	L_0		L_1		L_2	
Cộng tác viên số 1	/B ^a	/B ^b	/B ^c	/B ^d	/B ^e	/B ^f
Cộng tác viên số 2	/B	/B	/B	/B	/B	/B
Cộng tác viên số 3	/B	/B	/B	/B	/B	/B
v.v...	/B	/B	/B	/B	/B	/B
Tổng số	P_0	CP_0	P_1	CP_1	P_2	CP_2

^a số kết quả của phương pháp thay thế dương tính ở mức 0.
^b số kết quả của xác định phương pháp thay thế được khẳng định ở mức 0.
^c số kết quả của phương pháp thay thế dương tính ở mức 1.
^d số kết quả của phương pháp thay thế được khẳng định ở mức 1.
^e số kết quả của phương pháp thay thế dương tính ở mức 2.
^f số kết quả của phương pháp thay thế được khẳng định ở mức 2.

Tính phần trăm độ đặc hiệu (SP) của phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế, sử dụng dữ liệu sau khi khẳng định, dựa trên các kết quả của mức L_0 như sau:

Độ đặc hiệu của phương pháp chuẩn:

$$SP_{rel} = \left[1 - \left(\frac{P_0}{N_-} \right) \right] \times 100 \% \quad (6)$$

Độ đặc hiệu của phương pháp thay thế:

$$SP_{alt} = \left[1 - \left(\frac{CP_0}{N_-} \right) \right] \times 100 \% \quad (7)$$

Trong đó:

N_- là số phép thử L_0 ;

P_0 là tổng số lượng kết quả dương tính giả thu được với các mẫu trắng trước khi khẳng định;

CP_0 là tổng số kết quả dương tính giả thu được với các mẫu trắng.

Đối với mỗi mức L_1 và L_2 , kết quả của tất cả các cộng tác viên được nêu trong Bảng 9 đối với thiết kế nghiên cứu cặp đôi và trong Bảng 10 đối với thiết kế nghiên cứu không cặp đôi. Bảng 11 được chuẩn bị cho các dữ liệu tổng hợp từ tất cả các cộng tác viên đối với nghiên cứu cặp đôi và không cặp đôi.

Bảng 9 – Kết quả tóm tắt của tất cả cộng tác viên về nghiên cứu cặp đôi

Kết quả của phương pháp (chuẩn hoặc thay thế) trên mẫu			
Phương pháp chuẩn	Phương pháp thay thế ^a	Khẳng định phương pháp thay thế ^b	Diễn giải (dựa trên kết quả khẳng định của phương pháp thay thế)
+	+	Không cần thiết ^c	Thống nhất dương tính (PA)
-	-	Không cần thiết ^c	Thống nhất âm tính (NA)
+	-	Không cần thiết ^c	Sai lệch âm do kết quả của phương pháp thay thế âm tính giả (ND)
-	+	+	Sai lệch dương (PD)
-	+	-	Thống nhất âm tính do kết quả của phương pháp thay thế dương tính giả (NA) ^d

^a các kết quả của phương pháp thay thế bao gồm khẳng định như quy định trong quy trình của phương pháp thay thế.

^b các kết quả của phương pháp thay thế đã khẳng định là kết quả sau khi khẳng định thêm như quy định trong quy trình nghiên cứu xác nhận giá trị sử dụng.

^c Không cần phép thử khẳng định thêm. Kết quả của phương pháp thay thế đã khẳng định giống kết quả của phương pháp thay thế.

^d Kết quả dương tính giả (FP) phải được sử dụng để tính tỷ lệ dương tính giả.

Bảng 10 – Tóm tắt các kết quả của tất cả các cộng tác viên về nghiên cứu không cặp đôi

Kết quả của phương pháp (chuẩn hoặc thay thế) trên mẫu			
Phương pháp chuẩn	Phương pháp thay thế	Khẳng định ^b phương pháp thay thế	Diễn giải (dựa vào kết quả khẳng định của phương pháp thay thế)
+	+	+	Thống nhất dương tính (PA)
+	+	-	Sai lệch âm do kết quả của phương pháp thay thế dương tính giả (ND) ^c
-	-	-	Thống nhất âm tính (NA)
-	-	+	Thống nhất âm tính do kết quả của phương pháp thay thế âm tính giả (NA)
+	-	-	Sai lệch âm tính (ND)
+	-	+	Sai lệch âm tính do kết quả của phương pháp thay thế âm tính giả (NA)
-	+	+	Sai lệch dương tính (PD)
-	+	-	Thống nhất âm tính do kết quả của phương pháp thay thế dương tính giả

^a các kết quả của phương pháp thay thế bao gồm khẳng định như quy định trong quy trình của phương pháp thay thế.

^b kết quả của phương pháp thay thế được khẳng định là kết quả sau khi khẳng định thêm như mô tả trong quy trình của nghiên cứu xác nhận giá trị sử dụng.

^c các kết quả dương tính giả (FP) này phải được sử dụng để tính tỷ lệ dương tính giả.

Bảng 11 – Thống kê các kết quả đối với tất cả các cộng tác viên thu được với phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế với mức L_1 hoặc L_2

	Kết quả của phương pháp chuẩn dương tính (R+)	Kết quả của phương pháp chuẩn âm tính (R-)
Kết quả của phương pháp thay thế dương tính (A+)	+/+ Dương tính phù hợp (PA)	-/+ Sai lệch dương (PD)
Kết quả của phương pháp thay thế âm tính (A-)	+/- Sai lệch âm (ND)	-/- Âm tính phù hợp (NA)

Dựa trên dữ liệu thống kê trong Bảng 11, tính giá trị độ đáp ứng của phương pháp thay thế (8) và của phương pháp chuẩn (9), độ đúng tương đối (10) và tỷ lệ dương tính giả đối với phương pháp thay thế sau khi khẳng định thêm các kết quả (4) như sau:

$$\text{Độ đáp ứng của phương pháp thay thế: } SE_{\text{alt}} = \frac{(PA + PD)}{(PA + ND + PD)} \times 100 \% \quad (8)$$

$$\text{Độ đáp ứng của phương pháp chuẩn: } SE_{ref} = \frac{(PA + ND)}{(PA + ND + PD)} \times 100 \% \quad (9)$$

$$\text{Độ đúng tương đối: } RT = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100 \% \quad (10)$$

$$\text{Tỷ lệ dương tính giả đối với phương pháp thay thế: } FPR = \frac{FP}{NA} \times 100 \% \quad (11)$$

Trong đó: N là tổng số mẫu ($NA + PA + PD + ND$) và FP là các kết quả dương tính giả. Các phần giải thích từ viết tắt được sử dụng, xem Bảng 9, Bảng 10 và Bảng 11.

Các kết quả của phương pháp thay thế đã khẳng định phải được sử dụng để xác định xem kết quả của phương pháp thay thế có tương thích với kết quả của phương pháp chuẩn hay không.

5.2.4 Giải thích dữ liệu

5.2.4.1 Nghiên cứu cặp đôi

Đối với nghiên cứu **cặp đôi**, tính chênh lệch giữa ($ND - PD$) và tổng của ($ND + PD$) đối với mức có độ thu hồi từng phần (L_1 và có thể L_2). Các giá trị tìm thấy đối với ($ND - PD$) và ($ND + PD$) không được vượt quá giới hạn chấp nhận (ALs) nêu trong Bảng 12 với số phòng thử nghiệm tham gia (N_{lab}).

Bảng 12 – Giới hạn chấp nhận được đối với thiết kế nghiên cứu cặp đôi liên quan đến số lượng phòng thử nghiệm hợp tác

N_{lab}	(ND - PD)	(ND + PD)
10	3	4
11	4	4
12 đến 13	4	5
14 đến 16	4	6
17	4	7
18	5	7
19 đến 20	5	8

AL không đáp ứng được khi giá trị quan sát cao hơn AL. Khi AL không đáp ứng được, cần tiến hành điều tra (ví dụ, phân tích nguyên nhân gốc) để cung cấp lời giải thích về các kết quả quan sát được. Dựa vào thông tin AL và thông tin bổ sung, quyết định xem phương pháp thay thế có được coi là không phù hợp với mục đích hay không. Các lý do chấp nhận phương pháp thay thế trong trường hợp AL không đáp ứng được thì phải được nêu trong báo cáo nghiên cứu.

5.2.4.2 Nghiên cứu không cặp đôi

Đối với nghiên cứu không cặp đôi, tính chênh lệch giữa (ND - PD) với mức thu hồi từng phần thu được (L_1 và có thể là L_2). Giá trị quan sát được đối với (ND - PD) không được cao hơn AL. AL được xác định là $[(ND - PD)_{\max}]$ và được tính theo mức có độ thu hồi từng phần thu được như mô tả dưới đây sử dụng ba tham số sau:

$$(\rho^+)_{\text{ref}} = \frac{P_x}{N_x} \quad (12)$$

Trong đó:

P_x = số mẫu có kết quả dương tính thu được bằng phương pháp chuẩn ở mức x (L_1 hoặc L_2) đối với tất cả các phòng thử nghiệm;

N_x = số mẫu thử nghiệm ở mức x (L_1 hoặc L_2) thu được bằng phương pháp chuẩn của tất cả các phòng thử nghiệm.

$$(\rho^+)_{\text{sk}} = \frac{CP_x}{N_x} \quad (13)$$

Trong đó:

CP_x = số mẫu có kết quả dương tính đã được khẳng định thu được bằng phương pháp thay thế ở mức x (L_1 hoặc L_2) đối với tất cả các phòng thử nghiệm;

N_x = số mẫu đã thử nghiệm ở mức x (L_1 hoặc L_2) theo phương pháp thay thế được thực hiện tại tất cả các phòng thử nghiệm.

$$(ND - PD)_{\max} = \sqrt{3N_x \times ((\rho^+)_{\text{ref}} + (\rho^+)_{\text{sk}} - 2((\rho^+)_{\text{ref}} \times (\rho^+)_{\text{sk}}))}$$

Trong đó:

N_x = số mẫu đã thử nghiệm ở mức x (L_1 hoặc L_2) bằng phương pháp chuẩn được thực hiện tại tất cả các phòng thử nghiệm.

AL không đáp ứng được khi giá trị quan sát cao hơn AL. Khi AL không được đáp ứng, cần tiến hành điều tra (ví dụ, phân tích nguyên nhân gốc) để cung cấp lời giải thích về các kết quả quan sát được. Dựa vào thông tin AL và thông tin bổ sung, quyết định xem phương pháp thay thế có được coi là không phù hợp với mục đích hay không. Các lý do chấp nhận phương pháp thay thế khi AL không đáp ứng được phải nêu trong báo cáo nghiên cứu.

5.2.4.3 Sử dụng mức phát hiện tương đối

Ngoài ra, đối với nghiên cứu **cặp đôi** với cả nghiên cứu **không cặp đôi**, cũng cần đánh giá chênh lệch các mức phát hiện (RLOD) giữa các phòng thử nghiệm. Thực hiện việc đánh giá này theo Phụ lục E. VI chưa đủ kinh nghiệm về diễn giải kết quả theo phương pháp này nên kết quả được sử dụng chỉ để tham khảo.

Ngoài ra, dữ liệu có thể được đánh giá sử dụng xác suất mô hình phát hiện (POD) nêu trong Tài liệu tham khảo [14] và có trong hướng dẫn đánh giá trong tiêu chuẩn AOAC[®]. Đánh giá sử dụng mô hình POD có thể cho thông tin bổ sung về độ tương đương của các phương pháp.

6 Các phương pháp định lượng – Quy trình kỹ thuật về xác nhận giá trị sử dụng

6.1 Nghiên cứu so sánh phương pháp

6.1.1 Xem xét chung

Nghiên cứu so sánh phương pháp là một phần của quá trình xác nhận giá trị sử dụng được thực hiện trong phòng thử nghiệm tổ chức. Nghiên cứu này gồm có bốn phần:

- nghiên cứu so sánh các kết quả của phương pháp chuẩn với kết quả của phương pháp thay thế với nhiều thể loại mẫu bị nhiễm khác nhau (nhiễm tự nhiên và/hoặc nhiễm nhân tạo) (còn gọi là nghiên cứu độ đúng tương đối).
- nghiên cứu so sánh các kết quả của phương pháp chuẩn với kết quả của phương pháp thay thế trong các mẫu nhiễm nhân tạo sử dụng các phép lặp lại của từng loại sản phẩm trong một nhóm. Dữ liệu được phân tích sử dụng cách tiếp cận sơ đồ độ chính xác (AP) (còn gọi là nghiên cứu AP).
- giới hạn của nghiên cứu định lượng (LOQ) của các kết quả của phương pháp thay thế trong các mẫu nhiễm nhân tạo sử dụng các phép lặp lại của từng mật hàng sản phẩm trong một nhóm. Dữ liệu được sử dụng để tính LOQ của phương pháp thay thế. Nghiên cứu này chỉ thực hiện đối với các phương pháp công cụ (nghĩa là phương pháp không dựa trên số đếm khuẩn lạc riêng rẽ).
- nghiên cứu mục tiêu/loại trừ của phương pháp thay thế.

Các kết quả (các bảng và công thức tính) của các phần khác nhau và các diễn giải các kết quả, bao gồm các kết quả không phù hợp, phải được nêu rõ trong báo cáo nghiên cứu.

6.1.2 Nghiên cứu độ đúng tương đối

Nghiên cứu độ đúng tương đối là nghiên cứu so sánh giữa các kết quả thu được bằng phương pháp chuẩn và kết quả của phương pháp thay thế. Nghiên cứu này được thực hiện sử dụng các mẫu nhiễm tự nhiên và/hoặc nhiễm nhân tạo. Các nhóm, kiểu/loại và mật hàng khác nhau được thử nghiệm về mục đích này.

6.1.2.1 Chọn các nhóm để sử dụng

Việc chọn các nhóm và kiểu/loại sử dụng trong xác nhận giá trị sử dụng phụ thuộc vào kiểu/loại hoặc nhóm vi sinh vật và phạm vi đánh giá.

Nếu phương pháp này được áp dụng cho nhiều loại thực phẩm thì phải nghiên cứu ít nhất 5 nhóm thực phẩm. Báo cáo nghiên cứu xác nhận phải nêu rõ các nhóm thực phẩm được sử dụng trong nghiên cứu. Nếu phương pháp này được xác nhận giá trị sử dụng cho một số lượng hạn chế các nhóm thực phẩm, ví dụ: "sản phẩm thịt ăn ngay, xử lý nhiệt trước khi ăn" và "sữa chế biến nhiệt và các sản phẩm sữa", khi đó chỉ có thể nghiên cứu các nhóm này. Ngoài các nhóm thực phẩm, các mẫu thức ăn chăn nuôi, mẫu môi trường và mẫu trong giai đoạn sản xuất ban đầu có thể được đưa vào làm các nhóm bổ sung. Điều này sẽ mở rộng phạm vi sử dụng của phương pháp thay thế cho các nhóm bổ sung này.

Đối với tất cả các nhóm được chọn (thực phẩm và những sản phẩm khác), ít nhất phải có ba loại khác nhau cho mỗi nhóm được đưa vào nghiên cứu. Phụ lục A đưa ra tổng quan về các kiểu/loại và các nhóm liên quan cho mỗi loại vi sinh vật có thể liên quan đến việc xác nhận giá trị sử dụng. Phụ lục này cần được sử dụng để tạo điều kiện cho việc chọn các kiểu/loại và các hạng mục sản phẩm cho loại vi sinh vật có liên quan. Việc này không phải là lựa chọn bắt buộc.

Khi chọn mẫu để nghiên cứu, ưu tiên cao nhất là tìm những mẫu bị nhiễm tự nhiên. Nếu không có được đủ số mẫu nhiễm tự nhiên thì có thể dùng mẫu nhiễm nhân tạo (xem Phụ lục B và Phụ lục C). Đó là mong muốn rằng các mẫu thực phẩm đến từ dài nhiễm càng rộng càng tốt để giảm sai lệch bất kỳ so với mẫu thực phẩm cục bộ và mở rộng phạm vi xác nhận.

Cần đảm bảo rằng với việc chọn các loại nền mẫu có hệ vi khuẩn cao và thấp (tự nhiên) khác nhau, các kiểu/loại stress khác nhau do chế biến và nguyên liệu thô (chưa chế biến) được đưa vào nghiên cứu.

Ví dụ: Để xác nhận giá trị sử dụng phương pháp định lượng *Listeria monocytogenes* và nhóm thực phẩm "sản phẩm thịt ăn ngay, xử lý nhiệt trước khi ăn" các loại thực phẩm có thể là (1) các sản phẩm thịt nấu chín (hệ vi khuẩn nền thấp, ức chế nhiệt), (2) các sản phẩm thịt lên men hoặc sấy khô (hệ vi khuẩn nền cao, ức chế pH) và (3) sản phẩm đã xử lý (xông khói) ($a_w < 0,92$) (hệ vi khuẩn nền trung bình, a_w ức chế).

Ví dụ, trong một số trường hợp, đối với phương pháp thay thế có thể áp dụng cho nhiều loại thực phẩm, có thể kết hợp các nhóm "ăn ngay" và "nguyên liệu" từ cùng một nhóm sản phẩm. Ví dụ: các nhóm thịt nguyên liệu và sản phẩm ăn ngay vào một nhóm, có ba kiểu/loại được chia thành các loại nguyên liệu và ăn ngay. Việc chọn (kết hợp) các nhóm thực phẩm phải dựa trên phân tích nguy cơ.

6.1.2.2 Số lượng mẫu

Đối với mỗi nhóm cần được kiểm tra, tối thiểu phải thử nghiệm 15 mẫu và ít nhất phải sử dụng ba kiểu/loại trong nhóm đó. Đối với mỗi loại, phải thử nghiệm ít nhất 5 mẫu đại diện cho loại này. Điều này

dẫn đến tối thiểu 15 mẫu cho mỗi nhóm đang được thử nghiệm bằng cách sử dụng tối thiểu ba loại khác nhau. Các mẫu cần nhiễm ở mức đại diện về biến thiên tự nhiên của mức nhiễm. Tất cả các mẫu kết hợp phải bao gồm phạm vi nồng độ thường thấy đối với loại vi sinh vật được sử dụng.

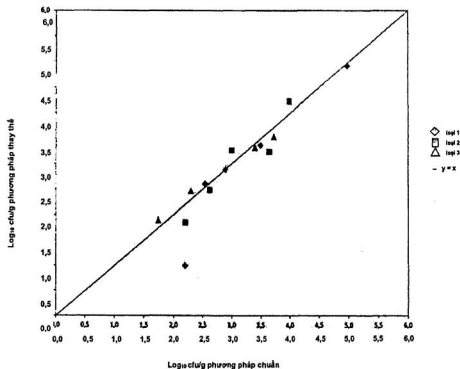
Một số mẫu bị nhiễm tự nhiên có thể chứa số lượng cao chất phân tích đích và điều này có thể làm khó khăn để có được dải nồng độ nhiễm yêu cầu. Trong trường hợp này, mẫu bị nhiễm tự nhiên có thể được "pha loãng" với các nguyên liệu không bị nhiễm của cùng một mặt hàng sản phẩm.

Các phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế phải được thực hiện với cùng một mẫu càng chính xác càng tốt.

6.1.2.3 Tính và diễn giải nghiên cứu độ đúng tương đối

Các kết quả thu được được phân tích sử dụng phương pháp Bland-Altman^[7]. Vẽ đồ thị dữ liệu từng mẫu cho mỗi nhóm và cho mỗi mẫu trong tất cả các nhóm và vẽ đường nhận dạng trên đó có tất cả các điểm nếu hai phương pháp cho kết quả giống nhau đối với từng mẫu phân tích. Hình 1 cho thấy ví dụ về một nhóm cụ thể. Đồ thị của một nhóm cụ thể cần cho thấy các kết quả của mỗi loại được thử nghiệm bằng một biểu tượng khác biệt. Đồ thị của tất cả các nhóm cần cho thấy các kết quả của từng nhóm thử nghiệm với một biểu tượng khác biệt. Điều này cho phép đánh giá trực quan nhanh về mức độ mà hai phương pháp (không) thống nhất. Nếu kết quả bất kỳ (của phương pháp chuẩn hoặc phương pháp thay thế) nằm dưới giới hạn định lượng thì dữ liệu phải được vẽ bằng cách sử dụng giá trị thay thế của $1 \log_{10}$ nhỏ hơn giá trị quan sát thấy trong trường hợp giá trị thấp hơn (ví dụ: $< 2 \log_{10}$ đơn vị sẽ được sửa đổi đến 1 đơn vị \log_{10}). Tương tự, giá trị bất kỳ lớn hơn giới hạn trên cần sửa bằng cách thêm $1 \log_{10}$ đơn vị nữa (ví dụ: $> 6 \log_{10}$ đơn vị sẽ được sửa đổi thành $7 \log_{10}$ đơn vị). Ví dụ, kết quả của phương pháp chuẩn $2,54 \log_{10}$ cfu/g và kết quả của phương pháp thay thế $< 2 \log_{10}$ cfu/g sẽ được vẽ trên đồ thị là 2,54 đối với phương pháp chuẩn và 1,0 đối với phương pháp thay thế. Thông tin (dựa trên điều tra, ví dụ: phân tích nguyên nhân gốc) có thể được nêu trong báo cáo nghiên cứu để giải thích về các phát hiện khi một trong những phương pháp đưa ra một kết quả dưới mức giới hạn định lượng.

Các giá trị sửa đổi này sẽ không được sử dụng để tính các dữ liệu được trình bày trong Bảng 13, nhưng phải được bao gồm trong đồ thị về chênh lệch (xem Hình 2).



Hình 1 – Đồ thị của kết quả phương pháp chuẩn so với phương pháp thay thế đối với một nhóm sản phẩm riêng rẽ

Xác định giá trị trung bình của mỗi cặp dữ liệu và chênh lệch giữa các giá trị như trong Bảng 13 và vẽ đồ thị (xem Hình 2) cho mỗi nhóm và cho tất cả các nhóm để minh họa mức độ sai lệch và sự thiếu đồng nhất của dữ liệu. Hình 2 cho thấy đường nhận diện (chênh lệch zero), đường của độ chệch và giới hạn độ tin cậy (CL) trên và dưới 95 % của độ chệch.

Bảng 13 – Kết quả thống kê đối với tất cả các nhóm

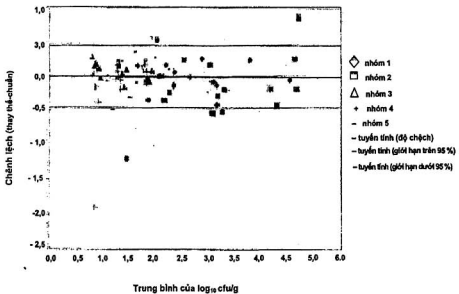
Nhóm	Kiểu/loại	Mẫu	Log ₁₀ cfu		Trung bình	Chênh lệch
			Phương pháp chuẩn	Phương pháp thay thế		
1	1	1	R1	A1	(R1 + A1)/2	D1 = A1 – R1
		2	R2	A2	(R2 + A2)/2	D2 = A2 – R2
		3	R3	A3	(R3 + A3)/2	D3 = A3 – R3
		4	R4	A4	(R4 + A4)/2	D4 = A4 – R4
		5	R5	A5	(R5 + A5)/2	D5 = A5 – R5
1	2	6	R6	A6	(R6 + A6)/2	D6 = A6 – R6
		7	R7	A7	(R7 + A7)/2	D7 = A7 – R7
		8	R8	A8	(R8 + A8)/2	D8 = A8 – R8
		9	R9	A9	(R9 + A9)/2	D9 = A9 – R9
		10	R10	A10	(R10 + A10)/2	D10 = A10 – R10
1	3
Trung bình nhóm 1					\bar{D}_1	
Độ lệch chuẩn của nhóm 1					s_{D1}	
...
x4			Rx	Ax	(Rx + Ax)/2	Dx = Ax – Rx
Trung bình nhóm x					\bar{D}_x	
Độ lệch chuẩn của nhóm x					s_{Dx}	
Trung bình của tất cả các nhóm					\bar{D}_{all}	
Độ lệch chuẩn của tất cả các nhóm					$s_{D\text{all}}$	

Tính chênh lệch trung bình \bar{D} độ lệch chuẩn của các chênh lệch s_D và các giới hạn thống nhất đối với từng nhóm và tất cả các nhóm sử dụng Công thức sau:

$$\left[\bar{D} \pm T \cdot s_D \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \right] \quad (15)$$

Trong đó n là số cặp dữ liệu, T là phần trăm của phân bố Student- t đối với xác suất β của dải đã chọn và $(n-1)$ bậc tự do, đó là: $T_{\left(\frac{1-\beta}{2}\right);(n-1)}$

Vẽ đồ thị theo Hình 2 các chênh lệch của mẫu riêng lẻ so với các giá trị trung bình trên đồ thị thể hiện đường nhận dạng (chênh lệch zero), đường của độ chệch và giới hạn tin cậy trên và dưới 95 % của độ thống nhất (CL) của độ chệch đối với tất cả các nhóm. Điều này minh họa độ chệch và (mức độ thiếu) sự thống nhất của dữ liệu. Hình 2 cho thấy biểu đồ đối với từng giá trị cùng với đường nhận dạng (chênh lệch zero), đường độ chệch và các giới hạn độ tin cậy trên và dưới 95 % của độ chệch.



Hình 2 – Đồ thị chênh lệch Bland-Altman đối với tất cả các nhóm

Các kết quả của độ chênh lệch và đồ thị phân tán sẽ được giải thích dựa trên quan sát trực quan về số lượng độ chệch và kết quả cực đoan. Điều này được mong đợi rằng không nhiều hơn một trong 20 giá trị dữ liệu sẽ nằm ngoài các giá trị CL. Mọi sự bất đồng so với dự kiến cần được ghi lại.

6.1.3 Nghiên cứu độ chính xác

Nghiên cứu về độ chính xác là một nghiên cứu so sánh giữa các kết quả thu được bằng phương pháp chuẩn và kết quả của phương pháp thay thế. Nghiên cứu này được tiến hành bằng cách sử dụng các mẫu nhiễm nhân tạo. Một kiểu/loại cho mỗi nhóm sẽ được thử nghiệm.

6.1.3.1 Chọn các nhóm để sử dụng

Xem 6.1.2.1.

6.1.3.2 Số lượng mẫu

Đối với mỗi nhóm được kiểm tra, ít nhất một kiểu/loại phải được thử nghiệm, sử dụng 6 mẫu cho mỗi kiểu/loại. Trong số sáu mẫu, cần có hai mức thấp, hai mức trung cấp và hai mức nhiễm cao. Các mức này phải bao gồm toàn bộ dải nhiễm của kiểu/loại được chọn. Đối với mỗi mẫu, phải sử dụng 5 lần lặp lại cho 5 phần mẫu thử khác nhau từ cùng một mẫu.

CHÚ THÍCH: Sáu mẫu có thể khác nhau thuộc cùng một kiểu/loại, nhưng không nhất thiết là cùng một mật hàng. Ví dụ, một mẫu có thể là sữa bột đủ béo, mẫu khác là thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh thuộc cùng một loại thực phẩm (sản phẩm sữa bột), nhưng không cùng một mật hàng thực phẩm (xem Phụ lục A).

6.1.3.3 Tính và diễn giải về nghiên cứu độ chính xác

Lập bảng các kết quả như trong Bảng 14 dựa vào số đếm log được chuyển đổi.

Bảng 14 – Kết quả của nghiên cứu độ chính xác (tính bằng \log_{10} cfu/g)

Nhóm	Kiểu/ loại	Hạng mục (mức)	Phương pháp chuẩn					Phương pháp thay thế				
			t.p. 1 (x_1) ^a	t.p. 2 (x_2)	t.p. 3 (x_3)	t.p. 4 (x_4)	t.p. 5 (x_5)	t.p. 1 (y_1) ^c	t.p. 2 (y_2)	t.p. 3 (y_3)	t.p. 4 (y_4)	t.p. 5 (y_5)
Nhóm 1	Kiểu/ loại 1	Mẫu 1 (thấp)										
		Mẫu 2 (thấp)										
		Mẫu 3 (trung bình)										
		Mẫu 4 (trung bình)										
		Mẫu 5 (cao)										
		Mẫu 6 (cao)										
.....										
Nhóm x	Kiểu/ loại x	Mẫu 1 - 6										

^a t.p. = phần mẫu thử
^b (x_n) = kết quả thử nghiệm \log_{10} của phương pháp chuẩn (x) đối với các phần mẫu thử từ 1 đến 5.
^c (y_n) = kết quả thử nghiệm \log_{10} của phương pháp thay thế (y) đối với các phần mẫu thử từ 1 đến 5.

Độ chính xác được sử dụng để kiểm tra yêu cầu rằng phương pháp thay thế cho kết quả đối với mẫu khác với giá trị thu được bằng phương pháp chuẩn nhỏ hơn một tiêu chí chấp nhận cụ thể. Quy trình của độ chính xác được giải thích chi tiết hơn trong Phụ lục G.

Ký hiệu sau được sử dụng: i đề cập đến mẫu và q là số lượng mẫu ($1 \leq i \leq q$); j đề cập đến các phần mẫu thứ và n là số lượng phần mẫu thứ ($1 \leq j \leq n$). Các phép tính được thực hiện cho mỗi nhóm/kiểu/loại theo trình tự các thao tác sau:

– x_i , kết quả thử nghiệm đã chuyển đổi \log_{10} của mẫu i đối với j lặp lại với $1 \leq i \leq q$ và $1 \leq j \leq n$ sử dụng phương pháp chuẩn;

– y_i , kết quả thử nghiệm đã chuyển đổi \log_{10} của mẫu i đề nhân bản j với $1 \leq i \leq q$ và $1 \leq j \leq n$ sử dụng phương pháp thay thế.

Đối với từng hạng mục mẫu hoặc mẫu, các phép đo được thực hiện trong các điều kiện lặp lại cho cả hai phương pháp, các giá trị y_i được coi là phân bố chuẩn. Khoảng dung sai dự kiến $\beta(\beta\text{-ETI})$ của các giá trị y_i được tính theo Tài liệu tham khảo [8]. Giả sử rằng độ lệch chuẩn kết hợp có thể tính được cho tất cả các mẫu hạng mục.

Giới hạn chấp nhận được đặt ở: $AL = \pm 0,5 \log_{10}$ đơn vị. Điều này được thể hiện như chênh lệch giữa phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế.

Bước 1: Đối với mỗi mẫu i , tính giá trị trung bình X_i theo trung bình của các số chuyển đổi \log_{10} thu được bằng phương pháp chuẩn, x_i . Các giá trị này là các giá trị của phương pháp chuẩn của các mẫu xác nhận giá trị sử dụng:

$$X_i = \text{trung bình } (x_i) \quad (16)$$

Bước 2: Đối với từng mẫu i , tính giá trị trung bình Y_i theo trung bình của các số chuyển đổi \log_{10} thu được bằng phương pháp thay thế, y_i . Các giá trị này là các giá trị thay thế của các mẫu xác nhận giá trị sử dụng:

$$Y_i = \text{trung bình } (y_i) \quad (17)$$

Bước 3: Đối với mỗi mẫu i , tính độ lệch chuẩn $s_{all,i}$ như sau: $s_{all,i} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (y_{ij} - Y_i)^2}$

Bước 4: Tính độ lệch chuẩn kết hợp s_{all} như sau: $s_{all} = \sqrt{\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q s_{all,i}^2}$

Bước 5: Tính độ lệch chuẩn kết hợp của phương pháp chuẩn s_{ref} (tương tự Bước 3 và Bước 4), như sau:

$$s_{ref} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (x_{ij} - X_i)^2} \quad (18)$$

Và

$$s_{\text{alt}} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{f=1}^n s_{f,t}^2} \quad (19)$$

Bước 6: Đối với mỗi mẫu i , tính độ chệch tuyệt đối theo chênh lệch của các trung bình tính được đối với cả hai phương pháp $B_i = Y_i - X_i$. Đây là ước tính độ thiếu chính xác của phương pháp thay thế so với phương pháp chuẩn.

Bước 7: Đối với từng mẫu i , tính các giới hạn β -ETI. Đây là khoảng mà tỷ lệ dự kiến của các kết quả trong tương lai sẽ giảm là β . Đối với mỗi mẫu, β -ETI được biểu thị như sau:

$$\left[B_i \pm T \cdot s_{\text{alt}} \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \right] \quad (20)$$

Trong đó T là phần trăm của phân bố Student- t đối với β xác suất đã chọn và $q \cdot (n - 1)$ bậc tự do (24 trong cài đặt không yêu cầu), đó là: $T_{\left(\frac{1-\beta}{2}\right); q(n-1)}$. Với mục đích của tiêu chuẩn này, β là 80 %. T là

hệ số phủ của β -ETI của mẫu xác nhận giá trị sử dụng. Điều này xác định giới hạn trên U_i và giới hạn dưới L_i :

$$U_i = B_i + T \cdot s_{\text{alt}} \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \quad \text{và} \quad L_i = B_i - T \cdot s_{\text{alt}} \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \quad (21)$$

Bước 8: Đối với mỗi nhóm, lập bảng các giá trị chênh lệch tính được cho các mẫu như trong Bảng 15.

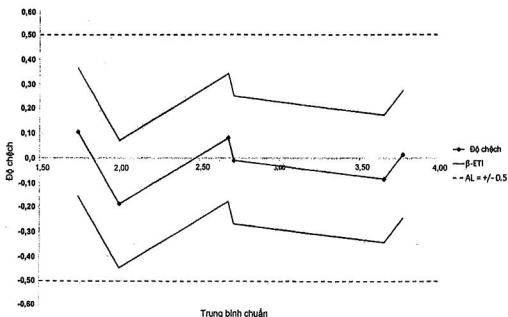
Bảng 15 – Thể hiện các kết quả thống kê của nghiên cứu so sánh

Nhóm	Mẫu	Giá trị trung tâm (chuẩn)	Giá trị trung tâm (thay thế)	Độ chệch	β -ETI trên	β -ETI dưới	AL trên	AL dưới
Nhóm 1	Mẫu 1	X_i	Y_i	B_i	U_i	L_i	+AL	-AL
	Mẫu 2							
	Mẫu 3							
	Mẫu 4							
	Mẫu 5							
	Mẫu 6							

Dạng đồ thị của các kết quả tính được như sau:

- trục hoành là các giá trị chuẩn X_i , tính theo các đơn vị \log_{10} ;
- trục tung là độ chệch, các giới hạn chấp nhận và giới hạn khoảng dung sai $U_i - X_i$ và $L_i - X_i$ tất cả tính bằng đơn vị \log_{10} theo chênh lệch giá trị chuẩn tương ứng của mẫu.

Vẽ biểu đồ như ví dụ nêu trong Hình 3. Các giới hạn khoảng dung sai trên và dưới được nối thành đường thẳng để nội suy các giới hạn giữa các mức khác nhau của các mẫu xác nhận giá trị sử dụng. Đường ngang thể hiện các giá trị chuẩn thu được với phương pháp chuẩn. Chênh lệch giữa các giá trị chuẩn và các mức nhiễm trung bình được thể hiện bằng các dấu chấm màu đen. Bất cứ khi nào không có độ chệch, các giá trị thu hồi này nằm trên đường tham chiếu nằm ngang. Ngoài ra, các giới hạn chấp nhận được thể hiện bằng hai đường ngang đứt và giới hạn β -ETI là các đường vạch liền.



Hình 3 – Ví dụ về độ chính xác đối với một nhóm trong nghiên cứu so sánh phương pháp

Nếu đối với tất cả i trong độ chính xác $U_i \leq AL$ và $L_i \geq -AL$ thì phương pháp thay thế được chấp nhận là tương đương với phương pháp chuẩn đối với các nhóm riêng lẻ và các nhóm kết hợp.

Nếu bất kỳ giới hạn trên hoặc giới hạn dưới vượt quá giới hạn chấp nhận và độ lệch chuẩn, $S_{\text{ref}} > 0,125$ thì thực hiện quy trình đánh giá bổ sung sau đây:

Bước 9: Tính các giới hạn chấp nhận mới theo hàm của độ lệch chuẩn: $AL_s = 4 \cdot S_{\text{ref}}$. Nếu đối với tất cả i trong độ chính xác $U_i \leq AL_s$ và $L_i \geq -AL_s$ thì phương pháp thay thế được chấp nhận là tương đương với phương pháp chuẩn đối với kiểu/loại và nhóm kết hợp đã nêu.

CHÚ THÍCH: Nếu $S_{rel} \leq 0,125$ thì giới hạn chấp nhận mới sẽ nhỏ hơn hoặc bằng 0,5. Đánh giá lần thứ hai cần cho kết quả tương tự như trong trường hợp trước đó.

Phương pháp thay thế được chấp nhận là tương đương với phương pháp chuẩn nếu tương đương với tất cả các nhóm riêng lẻ và các nhóm kết hợp. Ví dụ về việc sử dụng độ chính xác được nêu trong Phụ lục H. Cần điều tra (ví dụ, phân tích nguyên nhân gốc) để giải thích các phát hiện khi các phương pháp không tương đương đối với các nhóm riêng lẻ hoặc các nhóm kết hợp. Dựa vào các điều tra, quyết định xem các phương pháp được coi là tương đương hay không cho một nhóm hoặc các nhóm có liên quan. Kết quả đánh giá phải được nêu rõ trong báo cáo nghiên cứu.

Đối với việc tính toán độ chính xác, có sẵn bảng tính Excel® tại: <http://standards.iso.org/iso/16140> và chọn tập tin AP cho nghiên cứu so sánh phương pháp.

6.1.4 Giới hạn nghiên cứu định lượng

6.1.4.1 Xem xét chung

Đối với một số phương pháp thay thế, nên xác định giới hạn định lượng (LOQ). LOQ chỉ có liên quan khi quy trình đo của phương pháp thay thế không dựa trên số đếm các khuẩn lạc có thể nhìn thấy được của vi sinh đích và do đó phải xác định trong những trường hợp này. Các ví dụ về các phương pháp mà LOQ cần được xác định là đo tính dẫn điện hoặc huỳnh quang liên quan đến sự phát triển của vi sinh vật.

6.1.4.2 Chọn nhóm để sử dụng

Chọn cùng các nhóm và các kiểu/loại được sử dụng trong nghiên cứu độ chính xác (xem 6.1.2.1 và 6.1.3.2).

6.1.4.3 Số lượng mẫu

Nếu LOQ cần được xác định thì các mẫu trắng được kiểm tra đối với mỗi nhóm/kiểu/loại được sử dụng. Những mẫu trắng này được sử dụng để xác định giới hạn định lượng của phương pháp thay thế. Phải sử dụng ít nhất 10 phần mẫu thử từ cùng một mẫu. Kiểm tra các phần mẫu thử với phương pháp thay thế.

6.1.4.4 Tính và giải thích giới hạn của nghiên cứu định lượng

10 kết quả cho mỗi nhóm/kiểu/loại được sử dụng để ước tính độ lệch chuẩn ngưỡng hoặc độ lệch chuẩn đường nền. Tính độ lệch chuẩn s_0 của n kết quả như sau:

$$s_0 = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (22)$$

Trong đó:

n là tổng số phần mẫu thử được sử dụng;

y_i là kết quả chuyển đổi \log_{10} của phần mẫu thử i ;

\bar{y} là kết quả trung bình chuyển đổi \log_{10} của tất cả các phần mẫu thử.

Giới hạn định lượng được tính bằng $LOQ = 10 s_0$.

6.1.5 Nghiên cứu mục tiêu và loại trừ

Phép thử mục tiêu và loại trừ không bắt buộc đối với các phương pháp đếm tổng quát như đếm đĩa tổng số (TPC), phương pháp đếm nấm men và nấm mốc (Y & M). Thử nghiệm này cần thiết cho các phương pháp đếm được thiết kế cho các vi sinh vật cụ thể (ví dụ: *Listeria*).

6.1.5.1 Lựa chọn và số lượng các chủng thử nghiệm

Phải sử dụng một dãy các chủng. Các tiêu chí lựa chọn các chủng thử nghiệm được nêu trong Phụ lục E. Các chủng được sử dụng phải tính đến quy trình đo của phương pháp thay thế (ví dụ: nuôi cấy, phân tích miễn dịch và phân tử). Các quy trình đo khác nhau yêu cầu sử dụng các kênh thử nghiệm các chủng thử nghiệm khác nhau.

Mỗi chủng được sử dụng phải đặc trưng về sinh hóa và/hoặc huyết thanh học và/hoặc di truyền với đầy đủ chi tiết nhận dạng đã biết. Các chủng được sử dụng ưu tiên phải được phân lập từ thực phẩm, thức ăn chăn nuôi hoặc môi trường chế biến thực phẩm, hoặc sản xuất ban đầu có tính đến phạm vi xác nhận giá trị sử dụng. Tuy nhiên, cũng có thể sử dụng các chủng của bộ sưu tập các chủng bệnh viện và môi trường. Nguồn gốc xuất xứ của tất cả các chủng phân lập cần được biết và phải được lưu giữ nội bộ (ví dụ: phòng thử nghiệm chuyên ngành), bộ sưu tập chủng cấy của quốc gia hoặc quốc tế để có thể sử dụng để kiểm tra sau này, nếu cần.

Đối với phép thử mục tiêu, cần kiểm tra ít nhất 50 chủng thuần của vi sinh vật (đích).

Đối với phép thử loại trừ, cần kiểm tra ít nhất 30 chủng thuần của vi sinh vật (không phải đích).

Một số vi sinh vật sẽ khó hoặc không thể nuôi cấy như virus hoặc đơn bào ký sinh. Trường hợp sinh vật đích không thể nuôi cấy được, nên sử dụng các huyền phù của các chủng thử nghiệm để thêm chủng ở bước thích hợp sớm nhất của phương pháp.

Đối với một số vi sinh vật, sẽ rất khó khăn để có được số lượng yêu cầu của các chủng đối với phép thử mục tiêu và phép thử loại trừ. Trong những trường hợp này, các bên tham gia nghiên cứu xác nhận phải chọn một bộ các chủng thử nghiệm.

CHÚ THÍCH: Các hướng dẫn để bảo quản và duy trì các chủng trong các bộ sưu tập (địa phương) có thể được tìm thấy trong TCVN 8128 (ISO 11133)².

6.1.5.2 Các vi sinh vật đích (mục tiêu)

Mỗi phép thử được thực hiện một lần và bằng phương pháp thay thế, phương pháp chuẩn và một loại thạch không chọn lọc. Mức chủng cấy ít nhất phải cao hơn 100 lần so với mức tối thiểu để định lượng của phương pháp thay thế được xác nhận giá trị sử dụng. Khi sử dụng phương pháp đổ đĩa làm phương pháp thay thế, mức chủng cấy phải chứa số có thể đếm được trên đĩa. Nếu kết quả là âm tính, có thể xem xét để lặp lại các thử nghiệm với việc bổ sung một loại thực phẩm.

6.1.5.3 Các vi sinh vật không phải đích (loại trừ)

Mỗi phép thử được thực hiện một lần và với phương pháp thay thế và phương pháp chuẩn. Mức chủng cấy phải tương tự như mức nhiễm cao nhất dự kiến có trong bất kỳ nhóm nào được sử dụng. Không bổ sung thêm mẫu. Chủng cấy thuần cần phát triển trong canh thang không chọn lọc thích hợp ở các điều kiện sinh trưởng tối ưu ít nhất 24 h và được pha loãng đến mức thích hợp trước khi bắt đầu thử nghiệm.

Nếu sinh vật không thể nuôi cấy được, nên pha loãng huyền phù gốc đến mức thích hợp trước khi sử dụng.

6.1.5.4 Biểu thị và diễn giải kết quả

Lập bảng các kết quả như trong Bảng 16 đối với các phép thử mục tiêu và Bảng 17 đối với các phép thử loại trừ. Việc diễn giải do phòng thử nghiệm phụ trách nghiên cứu so sánh phương pháp thực hiện. Báo cáo cần nêu rõ mọi bất thường so với kết quả dự kiến.

Bảng 16 – Trình bày các kết quả đối với các phép thử mục tiêu

Vi sinh vật	Phương pháp chuẩn	Phương pháp thay thế	Thạch không chọn lọc
1			
2			
v.v...			

Việc giải thích dữ liệu của phép thử mục tiêu đối với phương pháp thay thế sử dụng môi trường đổ đĩa được thực hiện trên cơ sở định tính. Tuy nhiên, dữ liệu định lượng cần tạo thuận lợi cho việc giải thích dữ liệu.

Bảng 17 – Trình bày các kết quả đối với các phép thử loại trừ

Vi sinh vật	Phương pháp chuẩn	Phương pháp thay thế
1		
2		
v.v...		

6.2 Nghiên cứu liên phòng

6.2.1 Xem xét chung

Mục đích của nghiên cứu liên phòng thử nghiệm là so sánh hiệu quả của phương pháp thay thế với phương pháp chuẩn do các cộng tác viên khác nhau thực hiện, sử dụng các mẫu giống nhau trong các điều kiện tái lập và để so sánh các kết quả này với các tiêu chí đã được xác định trước về chênh lệch có thể chấp nhận được giữa phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế. Khi có thể, các điều kiện nghiên cứu cần phản ánh biến thiên chuẩn giữa các phòng thử nghiệm. Nghiên cứu liên phòng thử nghiệm do phòng thử nghiệm tổ chức thiết lập.

Kết quả (các bảng và các phép tính) của các bộ phận khác nhau và việc giải thích kết quả, bao gồm các kết quả khác nhau, phải được nêu rõ trong báo cáo nghiên cứu.

6.2.2 Quy trình đo

Nghiên cứu liên phòng thử nghiệm phải tạo ra ít nhất tám bộ dữ liệu hợp lệ từ ít nhất tám cộng tác viên. Các cộng tác viên tối thiểu phải đến từ bốn tổ chức khác nhau, nhưng tốt hơn là từ tám tổ chức không bao gồm phòng thử nghiệm tổ chức. Tối đa ba bộ dữ liệu có thể được tạo ra từ một tổ chức. Các kỹ thuật viên tham gia vào việc chuẩn bị các mẫu được sử dụng trong nghiên cứu liên phòng thử nghiệm sẽ không tham gia vào phép thử các mẫu này trong nghiên cứu liên phòng thử nghiệm.

CHÚ THÍCH: Các phòng thử nghiệm ở các địa điểm khác nhau, nhưng thuộc một công ty hoặc viện nghiên cứu, được chấp nhận là các tổ chức khác nhau.

Độ chính xác và độ chụm cần được tính từ một số lượng lớn các kết quả thử nghiệm lặp lại. Con số này phải là tối thiểu 96 kết quả đối với một hạng mục được chọn bao gồm tám cộng tác viên, ba mức nhiễu, hai phương pháp định lượng (chuẩn và thay thế) và các phép đo lặp lại, ví dụ: $8 \times 3 \times 2 \times 2 = 96$.

Các hướng dẫn chung để tiến hành các nghiên cứu liên phòng thử nghiệm được nêu trong TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Người tổ chức chịu trách nhiệm soạn thảo quy trình thử nghiệm và bảng dữ liệu để ghi lại tất cả dữ liệu thực nghiệm và điều kiện thử nghiệm quan trọng được sử dụng bởi mỗi phòng thử nghiệm. Mỗi cộng tác viên cần chứng tỏ năng lực của mình trong việc sử dụng phương pháp thay thế và phương pháp chuẩn trước khi tham gia nghiên cứu thích hợp.

Quy trình như sau:

- hạng mục phù hợp (để chọn xem phụ lục A) được sử dụng để chuẩn bị các mẫu thử nghiệm. Hạng mục này cần chứa hệ vi khuẩn nền tự nhiên.
- hạng mục được chọn có thể được nuôi cấy với vi sinh vật đích. Quy trình nuôi cấy mẫu phải phù hợp với hạng mục đã chọn. Các mẫu phải được chuẩn bị để đảm bảo sự đồng nhất giữa các mẫu sử dụng

các quy trình chuẩn bị có trong Phụ lục B và Phụ lục C. Nhìn chung, mẫu dạng lỏng (được so sánh với mẫu dạng rắn) đảm bảo sự đồng nhất hơn. Các mẫu phải được phòng thử nghiệm tổ chức đồng hóa. Các phép thử đồng hóa và các tiêu chí chấp nhận được nêu trong TCVN 9331 (ISO/TS 22117)⁴⁾.

- phải sử dụng ít nhất ba mức nhiễm khác nhau. Nồng độ chất phân tích phải được chọn để bao trùm tối thiểu các mức thấp, trung bình và cao của toàn bộ dải đo của phương pháp thay thế. Cần bao gồm thêm mức kiểm chứng âm.
- các mẫu lập được thử nghiệm bởi mỗi phòng thử nghiệm cộng tác ở ba mức nhiễm. Tất cả các mẫu phải được mã hoá mù để đảm bảo rằng các nhà phân tích không biết mức nhiễm của chúng.
- việc phân tích mẫu phải được thực hiện tại mỗi phòng thử nghiệm vào thời điểm quy định.

Phòng thử nghiệm tổ chức sử dụng tất cả các dữ liệu được ghi lại, phải xác định kết quả phù hợp sử dụng để phân tích dữ liệu. Phòng thử nghiệm tổ chức kiểm tra dữ liệu thô và các thông tin khác yêu cầu trong bảng dữ liệu để đảm bảo rằng tất cả các cộng tác viên đã thực hiện phân tích theo cả phương pháp thay thế và phương pháp chuẩn bằng văn bản. Khi có bằng chứng cho thấy kết quả có thể đã thu được trong các điều kiện không thích hợp và/hoặc các phương pháp không được tuân thủ nghiêm ngặt thì các kết quả này hoặc tất cả các kết quả từ cộng tác viên đó đều bị loại ra để phân tích thêm. Không có phép thử ngoại lệ nào được thực hiện trên dữ liệu đã chọn.

6.2.3 Tính toán, thống kê và diễn giải dữ liệu

Các kết quả thử nghiệm đã chuyển đổi sang \log_{10} của các cộng tác viên khác nhau cho cả hai phương pháp chuẩn và thay thế được nêu trong Bảng 18. Ghi lại các dữ liệu như sau:

- x_{jk} , kết quả thử nghiệm đã chuyển đổi sang \log_{10} ở mức i đối với độ lặp lại j của cộng tác viên k với $1 \leq i \leq q$, $1 \leq j \leq n$ và $1 \leq k \leq p$ sử dụng phương pháp chuẩn;
- y_{jk} , kết quả thử nghiệm đã chuyển đổi sang \log_{10} ở mức i đối với độ lặp lại j của cộng tác viên k với $1 \leq i \leq q$, $1 \leq j \leq n$ và $1 \leq k \leq p$ sử dụng phương pháp thay thế.

**Bảng 18 – Kết quả thống kê của nghiên cứu liên
phòng thử nghiệm trên mỗi mức phân tích (k)**

		Phương pháp chuẩn x_{jk}		Phương pháp thay thế y_{jk}	
Cộng tác viên (l)	Mức (k)	Kết quả		Kết quả	
1	Trắng				
2	Trắng				
v.v...	Trắng				
(l)	Trắng				
		Lặp lại 1	Lặp lại 2	Lặp lại 1	Lặp lại 2
1	Thấp				
2	Thấp				
v.v...	Thấp				
(l)	Thấp				
1	Trung bình				
2	Trung bình				
v.v...	Trung bình				
(l)	Trung bình				
1	Cao				
2	Cao				
v.v...	Cao				
(l)	Cao				

Các phép tính được thực hiện theo trình tự các thao tác bắt đầu với sự chuyển đổi sang \log_{10} của tất cả các kết quả thử nghiệm. Các ký hiệu sau đây được sử dụng: i dùng để chỉ mức và q là số lượng các mức ($1 \leq i \leq q$); j là độ lặp lại và n là số lần lặp lại ($1 \leq j \leq n$); k là cộng tác viên và p là số lượng cộng tác viên ($1 \leq k \leq p$). Các phép tính chi tiết được nêu trong Tài liệu tham khảo [9] hoặc Tài liệu tham khảo [13].

Bước 1: Đối với mỗi mức nhiệm, tính X_i là mức trung bình tổng thể của các kết quả lặp lại được chuyển sang \log_{10} thu được bằng phương pháp chuẩn x_{jk} đối với mẫu đã cho. Các giá trị trung bình này được gán các giá trị chuẩn của các mẫu được sử dụng trong nghiên cứu xác nhận giá trị sử dụng:

$$X_i = \frac{\sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^p X_{jk}}{np} \quad (23)$$

Bước 2: Tính đối với mỗi mức i (sử dụng y_{jk}), độ lệch tiêu chuẩn tái lập s_{Ri} như sau:

$$s_{Ri} = \sqrt{s_{\bar{y}}^2 + s_{\bar{x}}^2} \quad (24)$$

Quy trình này được mô tả chi tiết trong TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)¹⁾

Bước 3: Đối với mỗi mức, tính \bar{y}_i , trung bình tổng thể của phép đo được thực hiện bằng phương pháp thay thế.

Bước 4: Đối với mỗi mức, tính độ chệch tuyệt đối là $\bar{y}_i - X_i$. Đây là ước tính độ thiếu chính xác của phương pháp thay thế so với phương pháp chuẩn.

Bước 5: Đối với mỗi mức, tính các giới hạn β -ETI theo Tài liệu tham khảo [12]. β -ETI là khoảng mà tỷ lệ dự kiến của các kết quả sau này sẽ giảm là β .

a) với mỗi mức, β -ETI có thể được biểu thị như sau: $\bar{y}_i \pm k_M \cdot s_{Ti}$

Trong đó k_M biểu thị hệ số phủ và s_{Ti} độ lệch chuẩn của khoảng dung sai của mức i đã cho.

b) độ lệch chuẩn của khoảng dung sai bằng:

$$s_{Ti} = s_{Ri} \sqrt{1 + \frac{1}{p \cdot n \cdot G^2}} \quad (25)$$

c) hệ số phủ đối với mức i bằng $k_M = T$

Trong đó: $T = T(1/2 (1 - \beta), \nu)$, nghĩa là phần trăm phân bố t -student, β xác suất được chọn, p số lượng cộng tác viên, n số lặp lại và ν số bậc tự do. Đối với tiêu chuẩn này thì $\beta = 80\%$. Các thông số trung

$$\text{gian } G = \sqrt{\frac{H+1}{n \cdot H+1}} \text{ và } H = \frac{s_{\bar{y}}^2}{s_{\bar{x}}^2}$$

$$\text{Số lượng bậc tự do được tính như sau: } \nu = \frac{(H+1)^2}{\left(\frac{H+1}{n}\right)^2 + \frac{1-\frac{1}{n}}{p-1} + \frac{1}{p \cdot n}}$$

TCVN 12365-2:2018

CHÚ THÍCH 1: G, H và v sẽ có các giá trị khác nhau cho mỗi mức i và cần được lập chỉ số. Vì lý do dễ đọc, chỉ số i không được sử dụng ở đây.

CHÚ THÍCH 2: Số bậc tự do (đof) v không phải là một số nguyên và cần thiết để có được giá trị T đối với (đof) không phải số nguyên. Điều này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng bảng thống kê mở rộng hoặc bằng cách nội suy giữa hai giá trị trên và giá trị dưới được làm tròn của v .

CHÚ THÍCH 3: Cần sử dụng một phương pháp khác để tính β -ETI so với nghiên cứu so sánh phương pháp (xem 6.1.3.3) do các phép đo được thực hiện trong điều kiện tái lập lại của nghiên cứu liên phòng thử nghiệm và trong các điều kiện lặp lại của nghiên cứu so sánh phương pháp.

Bước 6: Đối với mỗi mức i , tính các giới hạn của β -ETI được biểu thị như sau: $[\bar{y}_i \pm k_{MI} \cdot s_{Ri}]$

Việc này xác định giới hạn trên U_i và giới hạn dưới L_i : $U_i = \bar{y}_i - k_{MI} \cdot s_{Ri}$ và $L_i = \bar{y}_i + k_{MI} \cdot s_{Ri}$

Bước 7: Dựng biểu đồ của kết quả tính được như sau:

- trục hoành cho các giá trị đích X_i tính bằng đơn vị \log_{10} ;
- trục tung cho giá trị độ chệch $\bar{y}_i - X_i$, các giới hạn chấp nhận AL ($\pm 0,50$ đơn vị log) và giới hạn khoảng dung sai $U_i - X_i$ và $L_i - X_i$ đều tính bằng \log_{10} là chênh lệch tương ứng giá trị chuẩn của mẫu.

Các kết quả được minh họa trong đồ thị mô tả độ chính xác như ví dụ nêu trong Phụ lục I (Hình I.2). Biểu đồ này được sử dụng như một công cụ hỗ trợ quyết định đồ họa. Giới hạn khoảng dung sai trên và dưới được nối với nhau thành đường thẳng để nội suy các mức chênh lệch của các mẫu xác nhận giá trị sử dụng. Đường ngang biểu thị các giá trị chuẩn thu được bằng phương pháp chuẩn. Chênh lệch giữa các giá trị chuẩn và mức nhiễm trung bình xác định được bởi phương pháp thay thế \bar{y}_i được biểu thị bởi các chấm màu đen. Khi không có độ chệch, các giá trị thu hồi này nằm trên đường chuẩn nằm ngang. Ngoài ra, giới hạn chấp nhận thể hiện bằng hai đường ngang bị cắt ngang và các giới hạn β -ETI là các đường kẻ đứt đoạn. Giới hạn chấp nhận được cài đặt ở $\pm 0,5 \log_{10}$.

Phương pháp thay thế được coi là tương đương với phương pháp chuẩn khi các giá trị β -ETI nằm trong các giới hạn chấp nhận đối với tất cả các mức nhiễm.

Bước 8: Nếu bất kỳ giá trị nào của β -ETI nằm ngoài giới hạn chấp nhận thì thực hiện quy trình đánh

giá bổ sung. Tính độ lệch chuẩn tái lập trung bình của phương pháp chuẩn $s_{R,ref} = \sqrt{\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q s_{Ri}^2}$

Bước 9: Tính các giới hạn chấp nhận mới là hàm số của độ lệch chuẩn: $AL_s = 3,3 \cdot s_{R,ref}$.

Nếu tất cả i trong độ chính xác $U_i - X_i \leq AL_s$ và $L_i - X_i \geq -AL_s$ thì phương pháp thay thế được chấp nhận là tương đương với phương pháp chuẩn.

AL không đáp ứng khi giá trị quan sát được cao hơn AL. Khi AL không được đáp ứng, nên tiến hành điều tra (ví dụ, phân tích nguyên nhân gốc) để cho lời giải thích về các kết quả quan sát được. Dựa vào thông tin AL và thông tin bổ sung, quyết định xem phương pháp thay thế có được coi là không phù hợp với mục đích của nhóm hoặc các nhóm liên quan không. Các lý do chấp nhận phương pháp thay thế trong trường hợp AL không đạt yêu cầu phải được nêu trong báo cáo nghiên cứu.

Để tính độ chính xác, xem bảng tính Excel[®] tại <http://standards.iso.org/iso/16140> và sau đó chọn tập tin AP cho nghiên cứu liên phòng thử nghiệm.

Một ví dụ về việc áp dụng độ chính xác cho các nghiên cứu liên phòng thử nghiệm được nêu trong Phụ lục I.

Phụ lục A

(Tham khảo)

**Phân loại mẫu và các kết hợp đích đề xuất cho
nghiên cứu xác nhận giá trị sử dụng**

Bảng A.1 đưa ra việc phân loại các thực phẩm chủ yếu để hướng dẫn các nhà phát triển phương pháp xác nhận giá trị sử dụng phương pháp thay thế. Các đặc tính nội tại của thực phẩm như mức hệ vi sinh vật vốn có, hàm lượng chất béo, độ pH, hàm lượng muối, hoạt độ nước và sự có mặt của các hợp chất kháng khuẩn có thể có ảnh hưởng đáng kể đến kết quả của phương pháp. Do đó, tính chất nội tại của thực phẩm đã được xem xét trong phạm vi có thể khi phân loại thực phẩm, nhưng tính đa dạng của thực phẩm sẵn có làm cho việc xem xét này khó áp dụng cho kiểu/loại thực phẩm vượt quá mức.

Các cơ quan quản lý khác nhau thường có những yêu cầu hơi khác nhau về phân loại thực phẩm. Những khác biệt này đã được bao gồm trong phần chú thích của Bảng A.1 càng nhiều càng tốt.

Bảng A.1 – Phân loại mẫu và sự liên quan của chúng đối với thử nghiệm các vi sinh vật khác nhau

Nhóm thực phẩm	Kiểu/loại	Mặt hàng (một số ví dụ)	Tổng số đếm vi khuẩn sống	Vi khuẩn lactic	Nấm men và nấm mốc	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococcus	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogene	E. coli sinh độc tố Shiga (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	Yersinia enterocolitica (gây bệnh)	Vibrio spp.	Bacillus cereus (tế bào sinh hoặc bào tử)	Clostridium perfringens (tế bào sinh hoặc bào tử)	Clostridium botulinum (tế bào sinh hoặc bào tử)
Sữa tươi	Sữa tươi nguyên liệu	Sữa tươi nguyên liệu	Y			Y		Y	Y	Y	Y	Y		Y					
	Sữa tươi lên men/đã axit hóa, men/đã axit hóa, yogurt từ sữa tươi	Sữa tươi lên men/đã axit hóa, yogurt từ sữa tươi					Y			Y	Y	Y			Y				
Sữa nguyên liệu và sản phẩm sữa	Sữa nguyên liệu	Bơ nguyên liệu				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y				
	Sản phẩm sữa	Cream nguyên liệu				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y				
Sữa nguyên liệu và sản phẩm sữa	Sữa nguyên liệu	Phomat cứng và nửa cứng (ví dụ: Comté, Beaufort)				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y				
	Sản phẩm sữa	Phomat xanh (phomat rócophô)				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y				
		Phomat mềm (ví dụ: Brie, Munster)				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y				

Bảng A.1 (tiếp theo)

Nhóm thực phẩm	Kiểu/loại	Mặt hàng (một số ví dụ)	Tổng số ô nhiễm vi khuẩn sống	Vi khuẩn lactic	Nấm men và nấm mốc	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococcus aureus	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogene	E. coli sinh độc tố Shiga (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	Yersinia enterocolitica (gây bệnh)	Vibrio spp.	Bacillus cereus (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium perfringens (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium botulinum (tế bào sinh đường hoặc bào tử)
Sữa chua và sữa chua uống	Sản phẩm sữa thanh trùng	Món ăn từ sữa, kem lạnh thực phẩm, đồ uống, cream	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		
	Sản phẩm sữa hộp hoặc UHT	Sữa UHT, sữa asept, sữa hộp, cream															Y		
Sữa chua và sản phẩm sữa	Sản phẩm sữa thanh trùng	Sữa lên men/ sữa chua thành trùng/yoghurt, sản phẩm sữa			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		
	Sản phẩm sữa và sữa chua	Sữa thanh trùng, Cream	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		
Sữa chua và sản phẩm sữa	Sản phẩm sữa thanh trùng	Phomat cứng và nửa cứng (sốt ly nhiệt) (Mức: Comite, Emmen-tal, Gouda)			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y								
	Sản phẩm sữa và sữa chua	Phomat xanh (Bleu de Bresse)					Y	Y	Y	Y	Y								
Dạng khô	Sữa bột	Phomat mềm (Mức: Brie, Munster)	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y								Y
	Sữa bột làm bánh	Sữa bột làm bánh	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		

Bảng A.1 (tiếp theo)

Nhóm thực phẩm	Kiểu/loại	Mật hàng (một số ví dụ)	Tổng số đếm vi khuẩn sống	Vi khuẩn lactic	Nấm men và nấm mốc	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococcus aureus	Salmoneella spp.	Listeria spp.	L. monocytogene	E. coli độc tố Shiga (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	Yersinia enterocolitica (gây bệnh)	Vibrio spp.	Bacillus cereus (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium perfringens (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium botulinum (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	
Thịt nguyên liệu và sản phẩm thịt chế biến sẵn (trừ gia cầm)	Thịt tươi (chưa chế biến)	Thịt tươi, thịt cắt miếng	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y					
		Thịt xay, thịt băm	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y					
Sân để nấu (đã chế biến)	Sân để nấu (đã chế biến)	Thịt tươi, làm bông, nước nấu	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y					
		Burger đông lạnh, thịt bò	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y					
Sân phẩm thịt đã nấu	Thịt lợn men hoặc sản phẩm thịt đã sấy khô	Thịt xông khói, pate	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y		Y	Y	Y	Y
		Salami	Y				Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y					
Sân phẩm thịt đã chế biến để ăn ngay, cần làm nóng lại	Nguyên liệu đã xử lý (xông khói) (a _w < 0,92)	Filet de sax, mỡ lợn	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y		Y	Y	Y	Y
		Thịt xông khói khô	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y					
Thịt hộp (ôn định ở nhiệt độ thường)	Thịt hộp (ôn định ở nhiệt độ thường)	Thịt hộp đông																		Y
		Thịt hộp (đông)																		Y

Bảng A.1 (tiếp theo)

Nhóm thực phẩm	Kiểu/loại	Mặt hàng (một số ví dụ)	Tổng số đếm vi khuẩn sống	Vi khuẩn lactic	Nấm men và nấm mốc	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococcus aureus	Salm-onella spp.	Lis-teria spp.	L. monocytogene	E. coli sinh độc tố Shiga (STEC)	Crono-bacter spp.	Cam-pylo-bacter	Yersinia enterocolitica (gây bệnh)	Vibrio spp.	Bacillus cereus (tế bào sinh dưỡng hoặc bào tử)	Clostridium perfringens (tế bào sinh dưỡng hoặc bào tử)	Clostridium botulinum (tế bào sinh dưỡng hoặc bào tử)	
Thịt gia cầm nguyên liệu và sản phẩm đã chuẩn bị sẵn để nấu	Thịt tươi (chưa chế biến)	Thịt cật, cật miếng	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y						
		Thịt đùi, lườn bông, nước rửa	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y						
		Thịt xay và sản phẩm thịt	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y						
		Sản phẩm đã chuẩn bị để nấu (đã chế biến)	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y						
Sân phẩm thịt đã chế biến	Sân phẩm thịt đã chế biến	Thịt gà tây đã nấu	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y			Y	Y	Y	
		Xúc xích gà	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y				Y			Y	Y	Y
		Gà tây phile xông khói (α<0,52)	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y				Y			Y	Y	Y
Sân phẩm thịt gia cầm ăn ngay, làm nóng trước khi ăn	Đồ hộp (ôn định ở nhiệt độ thường)	Thịt gia cầm đông hộp, pate nguội đóng hộp																		Y

Bảng A.1 (tiếp theo)

Nhóm thực phẩm	Kiểu loại	Mật hàng (mật số vi dụ)	Tổng số đếm vi khuẩn sống	Vi khuẩn lactic	Nấm men và nấm mốc	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococcus aureus	Salm-onella spp.	Listeria spp.	L. monocytogene	E. coli sinh độc tố Shiga (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter spp.	Yersinia enterocolitica (gây bệnh)	Vibrio spp.	Bacillus cereus (tế bào sinh dưỡng hoặc bào tử)	Clostridium perfringens (tế bào sinh dưỡng hoặc bào tử)	Clostridium botulinum (tế bào sinh dưỡng hoặc bào tử)
	Trứng (chưa chế biến)	Trứng quả	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y				Y	
	Sản phẩm trứng (xử lý nhiệt) có phụ gia (muối hoặc đường > 2%)	Lòng đỏ trứng, lòng trắng trứng, trứng nguyên quả	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y								
Trứng và sản phẩm trứng	Sản phẩm trứng (GS xử lý nhiệt) không có phụ gia	Lòng đỏ trứng, lòng trắng trứng, trứng nguyên quả	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y	Y	
	Dạng lỏng	Bột trứng	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y	Y	
	Cá (chưa chế biến)	Cá	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y					
	Động vật có vỏ (chưa chế biến)	Hàu, ngao, sò điệp, vẹm	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y					
Cá và hải sản tươi và sẵn sàng để nấu (chưa chế biến)	Động vật giáp xác (chưa chế biến)	Tôm, cua và thịt cua, tôm hùm	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y					
	Cá sẵn sàng để nấu và thực phẩm biển (GS qua chế biến)	Cá hình que đồng lạnh																	

Bảng A.1 (tiếp theo)

Nhóm thực phẩm	Kiểu loại	Mặt hàng (mô tả số vi dụ)	Tổng số đơn vị khuẩn sống	Vi khuẩn lactic	Nấm men và nấm mốc	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococci dương tính coagulase	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogene	E. coli sinh độc tố Shiga (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	Yersinia enterocolitica (gây bệnh)	Vibrio spp.	Bacillus cereus (tế bào sinh dưỡng hoặc bào tử)	Clostridium fragens (tế bào sinh dưỡng hoặc bào tử)	Clostridium botulinum (tế bào sinh dưỡng hoặc bào tử)
	Sản phẩm thủy sản đã nấu chín	Các sản phẩm có vỏ và đã bỏ vỏ của động vật giáp xác đã nấu chín, cá và hải sản	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y		Y	Y	Y	Y
	Các sản phẩm thủy sản được xử lý và ướp muối	Cá muối, cá cơm	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y			Y		
Các sản phẩm thủy sản đông lạnh để gia nhiệt lại	Sản phẩm thủy sản đã xông khói hoặc xử lý và các sản phẩm khác đã chế biến lại (a→0,92)	Cá xông khói, Sản phẩm thủy sản đã xông khói hoặc xử lý và các sản phẩm khác đã chế biến lại (a→0,92)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y		Y	Y		Y
	Đồ hộp (ổn định ở nhiệt độ thường)	Cá hộp, cua hộp															Y	Y	Y

Bảng A.1 (tiếp theo)

Nhóm thực phẩm	Kiểu loại	Mặt hàng (mô tả số vị dụ)	Tổng số đếm vi khuẩn sống	Vi khuẩn lactic	Nấm men và nấm mốc	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococcus aureus	Salm. onella spp.	Listeria spp.	L. monocytogene	E. coli sinh độc tố Shiga (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	Yersinia enterocolitica (Gây bệnh)	Vibrio spp.	Bacillus cereus (tê bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium perfringens (tê bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium botulinum (tê bào sinh đường hoặc bào tử)
	Rau quả tươi cắt lát ăn ngay	Hộp hộp trái cây	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y		Y			
	Rau đã cắt nhỏ sẵn để ăn	Rau quả cắt lát, xả lách, cà rốt thái nhỏ bao gói sẵn	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y		Y			
	Sản phẩm được trồng trong hoặc tiếp xúc với đất	Khoai tây, củ cải, khoai lang, sắn, thực phẩm được cắt nhỏ, rau củ cải				Y	Y		Y	Y	Y	Y		Y		Y			
Sản phẩm rau quả tươi	Rau mầm	Đậu nành, củ cải, củ hành, củ cải	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y		Y			
	Nước quả/nước rau (chưa thanh trùng)	Nước ép trái cây, nước ép cà rốt	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y		Y			Y
	Rau lá xanh	Basil, rau mùi, hành lá, rau diếp và rau mùi tây			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y		Y			
	Rau và quả (chưa chế biến) không bao gồm ở trên	Sản phẩm cây trồng				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y		Y			

Bảng A.1 (tiếp theo)

Nhóm thực phẩm	Kiểu/loại	Mặt hàng (một số ví dụ)	Tổng số điểm vi khuẩn sống	Vi khuẩn lactic	Nấm men và nấm mốc	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococci dương tính coagulase	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogene	E. coli sinh độc tố Shiga (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	Yersinia enterocolitica (gây bệnh)	Vibrio spp.	Bacillus cereus (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium perfringens (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium botulinum (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	
	Nước rau quả đã xử lý nhiệt	Nước táo thanh trùng	Y						Y	Y	Y						Y	Y	Y	
	Bồ hộp rau quả (ôn định ở nhiệt độ thường)	Dứa đóng hộp																		
Rau quả chế biến	Rau quả đã xử lý nhiệt	Rau bina đóng hộp, rau đông lạnh	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y	Y	Y	
	Rau lên men / axit hóa	Cà chua muối, bắp cải muối	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y	Y	Y	
	Quả IMF và sữa chua (e_w<0,85)	Syro, nước quả cô đặc, sữa chua, sữa chua men	Y		Y			Y	Y								Y			
	Gia vị thảo mộc	Gia vị thảo mộc	Y		Y			Y	Y								Y			
Ngũ cốc, quả, hạt khô	Hạt loại củ và hạt	Hạt lạc, hạt dẻ, và các loại hạt khác	Y		Y			Y	Y	Y	Y						Y			
Hạt và rau	Rau quả khô (e_w<0,60)	Rau đông khô	Y		Y				Y	Y	Y						Y			
	Đậu đỗ khô	Ngũ, kê, ngô cốc ăn thành	Y		Y				Y	Y	Y						Y			
	Bột	Lúa mì, kiều mạch, kê	Y		Y				Y	Y	Y						Y			

Bảng A.1 (tiếp theo)

Nhóm thực phẩm	Kiểu loại	Mặt hàng (một số ví dụ)	Tổng số đếm vi khuẩn sống	Vi khuẩn lactic	Nấm men và nấm mốc	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococci dương tính coagulase	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogene	E. coli sinh độc tố Shiga (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	Yersinia enterocolitica (gây bệnh)	Vibrio spp.	Bacillus cereus (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium fringens (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium botulinum (tế bào sinh đường hoặc bào tử)
Các thành phần probiotic	Các thành phần không phải probiotic	Bột vi khuẩn sấy phun đã trộn sẵn	Y		Y	Y		Y	Y				Y				Y		
		Sữa khô, yogurt khô, các quả mọng khô	Y		Y	Y		Y	Y					Y				Y	
Sữa công thức và ngũ cốc cho trẻ sơ sinh	Thực ăn công thức cho trẻ sơ sinh không phải probiotic	Sản phẩm whey (sữa) bổ sung đầu nành (rau)	Y			Y	Y	Y	Y				Y				Y		
		Sản phẩm whey (sữa) bổ sung đầu nành (rau)	Y			Y	Y	Y	Y				Y					Y	
Sữa công thức và ngũ cốc cho trẻ sơ sinh	Thực ăn công thức cho trẻ sơ sinh có probiotic	Ngũ cốc cho trẻ sơ sinh	Y		Y	Y	Y	Y	Y				Y				Y		
		Ngũ cốc cho trẻ sơ sinh có probiotic	Y		Y	Y	Y	Y	Y				Y					Y	
Sữa công thức và ngũ cốc cho trẻ sơ sinh	Thực ăn công thức cho trẻ sơ sinh có probiotic	Ngũ cốc cho trẻ sơ sinh có probiotic	Y		Y	Y	Y	Y	Y				Y				Y		
		Ngũ cốc cho trẻ sơ sinh có probiotic	Y		Y	Y	Y	Y	Y				Y					Y	

Bảng A.1 (tiếp theo)

Nhóm thực phẩm	Kiểu/loại	Mặt hàng (một số ví dụ)	Tổng số đếm vi khuẩn sống	Vi khuẩn lactic	Nấm men và nấm mốc	Eritrobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococci đường ruột	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogene	E. coli sinh độc tố Shiga (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	Yersinia enterocolitica (gây bệnh)	Vibrio spp.	Bacillus cereus (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium perfringens (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium botulinum (tế bào sinh đường hoặc bào tử)
	Bánh ngọt	Sản phẩm bánh quy, bánh custard, keo	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		
	Dạng bột khô	Hỗn hợp bánh	Y		Y			Y	Y	Y	Y							Y	
Chocolat, bánh, keo	Độ ẩm thấp	Cracker, bánh mì và bánh cookie	Y		Y			Y	Y								Y		
	Khô, ít đường, độ ẩm thấp ($a_w < 0,85$)	Bánh, praline, marzipan	Y		Y			Y	Y								Y		
	Khô, ít đường, độ ẩm thấp ($a_w < 0,85$)	Bánh quy, chocolat, keo, mặt ong, đường, xyro	Y		Y			Y	Y								Y		

Bảng A.1 (tiếp theo)

Nhóm thực phẩm	Kiểu loại	Mật hàng (mô tả số vi dụ)	Tổng số đếm vi khuẩn sống	Vi khuẩn lactic	Nấm men và nấm mốc	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococci dương tính coagulase	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogene	E. coli độc tố Shiga (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	Yersinia enterocolitica (gây bệnh)	Vibrio spp.	Bacillus cereus (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium perfringens (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium botulinum (tế bào sinh đường hoặc bào tử)
	Thực phẩm hỗn hợp có thành phần nguyên liệu khô (trừ bánh ngọt)	Xà lách lạnh, bánh sandwich, bún đậu, bả-variant	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y	Y	Y
Thực phẩm nhiều thành phần	Thực phẩm chế biến hỗn hợp (đã nấu)	Đồ ăn nóng	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y				Y	Y	Y
	Sản phẩm sẵn để gia nhiệt làm lạnh lại	Thực phẩm đông lạnh, cơm hoặc mì ống, vol-au-vent trong chân không	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y			Y	Y	Y
	Sản phẩm sẵn để gia nhiệt đông lạnh	Khoai tây chiên đông lạnh, pizza, bánh sừng bò	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y	Y	Y

Bảng A.1 (tiếp theo)

Nhóm thực phẩm	Kiểu/loại	Mặt hàng (một số ví dụ)	Tổng số đếm vi khuẩn sống	Vi khuẩn lactic	Nấm men và nấm mốc	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococci dương tính cho coagulase	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogene	E. coli sinh độc tố Shiga (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	Yersinia enterocolitica (gây bệnh)	Vibrio spp.	Bacillus cereus (tế bào sinh dưỡng hoặc bào tử)	Clostridium perfringens (tế bào sinh dưỡng hoặc bào tử)	Clostridium botulinum (tế bào sinh dưỡng hoặc bào tử)
	Thực phẩm gia nhiệt trước khi ăn, ăn định ở nhiệt độ thường (đồ hộp)	Voi-au-went đứng trong chai thủy tinh												Y			Y	Y	Y
	Thực phẩm gia nhiệt trước khi ăn; đồ khô	Xúp khô (ăn liền)	Y						Y	Y	Y						Y	Y	Y
Thực phẩm/ thức ăn có nhiều thành phần	X Salat có mayonnaise (chua) có các thành phần nguyên liệu thô	X Salat rau có nước sốt	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y			Y		Y
	X Salat có mayonnaise (chua) có các thành phần đã chế biến	Bánh sandwich phết	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		Y
	Thực phẩm có axit ăn định ở nhiệt độ thường (pH <4,8)	Tương cà chua, nước sốt, mayonnaise, mù tạt	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		Y

Bảng A.1 (tiếp theo)

Nhóm thực phẩm	Kiểu/loại	Mặt hàng (một số ví dụ)	Tổng số đếm vi khuẩn sống	Vi khuẩn lactic	Nấm men và nấm mốc	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococcus aureus	Salm. enteritidis	Listeria spp.	L. monocytogenes	E. coli sinh độc tố Shiga (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	Yersinia enterocolitica (gây bệnh)	Vibrio spp.	Bacillus cereus (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium perfringens (tế bào sinh đường hoặc bào tử)	Clostridium botulinum (tế bào sinh đường hoặc bào tử)
Thực phẩm cho động vật cảnh và thực ăn chăn nuôi	Các thành phần có nguồn gốc động vật	Bột thịt và bột xương, bột gà, bột cá, chất thùy phân từ động vật	Y		Y	Y	Y	Y	Y						Y		Y		
	Các thành phần có nguồn gốc thực vật	Bột ngô, bột đậu nành, rau	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
	Các thành phần khác	Các sản phẩm vi khuẩn như chiết xuất từ nấm men, probiotic	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
	Thực phẩm khô ($a_{w} < 0.7$)	Viên xơ	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
Thực phẩm ướt ($a_{w} > 0.7$)	Thực phẩm ăn uống	Thịt tươi, xúc xích	Y		Y	Y	Y	Y	Y						Y		Y	Y	Y
	Đồ hộp	Thịt, cá	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
	Thực phẩm chăn nuôi (bò, bê, lợn)	Đậu đỗ, bột	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
	Thực phẩm chăn nuôi (gia cầm)	Đậu đỗ, bột	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
Thực phẩm chăn nuôi (cá)	Đậu đỗ, bột	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y			

Bảng A.1 (kết thúc)

Nhóm thực phẩm	Kiểu loại	Mật hàng (mật số vi dụ)	Tổng số đếm vi khuẩn sống	Vi khuẩn lactic	Nấm men và nấm mốc	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococcus aureus	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogene	E. coli sinh độc tố Shiga (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	Yersinia enterocolitica (gây bệnh)	Vibrio spp.	Bacillus cereus (tế bào sinh hoặc bào tử)	Clostridium fringens (tế bào sinh hoặc bào tử)	Clostridium botulinum (tế bào sinh hoặc bào tử)
Các mẫu môi trường (tản xuất thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi)	Thiết bị, dụng cụ hoặc môi trường sản xuất	Tắm bồn, bụi	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y
	Nước dùng trong quá trình chế biến	(tái sử dụng) nước rửa, nước chế biến	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y
Mẫu từ giai đoạn sản xuất ban đầu (PPS)	Phân động vật	Mẫu tắm bồn (tùng, bồn), phân							Y			Y		Y	Y				
	Mẫu môi trường và không phải phân	Mẫu bụi, tấm vệ sinh, nước uống, mẫu vật, mẫu thử ở gia đình							Y			Y		Y	Y				

CHÚ THÍCH 1: Một số nhóm hoặc các hạng mục có thể được gộp lại hoặc tách ra, nếu thích hợp.

CHÚ THÍCH 2: Một số cơ quan quản lý có các yêu cầu cụ thể để phê duyệt nghiên cứu xác nhận giá trị sử dụng.

CHÚ THÍCH 3: Sản phẩm chưa qua chế biến, theo quy định của Ủy ban Châu Âu (EC) số 852/2004, được định nghĩa là "Thực phẩm chưa qua chế biến và bao gồm các sản phẩm đã được chia nhỏ, tách, chặt, thái lát, nghiền nhỏ, lột da, làm sạch, cắt tía, bóc vỏ, xay xát, ướp lạnh, đông lạnh, đông lạnh sâu hoặc rã đông". Điều này không bao gồm các quy trình vệ sinh theo quy định. Do đó, cần phân biệt giữa các sản phẩm nguyên liệu và các sản phẩm cần được làm vệ sinh. Do đó có các định nghĩa khác nhau đối với các sản phẩm chế biến và chưa chế biến.

VÍ DỤ: Thịt tươi Quy định của EC No 853/2004 là thịt chưa qua quá trình nào khác ngoài bảo quản lạnh, làm lạnh hoặc đông lạnh nhanh bao gồm thịt được gói bằng chân không hoặc bọc trong môi trường có kiểm soát.

CHÚ THÍCH 4: Chế biến theo Quy định (EC) 852/2004 là "Bất kỳ hành động nào làm thay đổi đáng kể sản phẩm ban đầu bao gồm gia nhiệt, xông khói, muối, làm chín, sấy khô, ngâm muối, chiết, ép đùn hoặc kết hợp của các quá trình này". Các sản phẩm chế biến có thể chứa các thành phần cần thiết cho quá trình chế biến hoặc tạo ra các đặc tính cụ thể cho sản phẩm. Các cơ quan có thẩm quyền khác nhau có các định nghĩa khác nhau đối với các sản phẩm đã qua chế biến và chưa chế biến.

CHÚ THÍCH 5: Sản phẩm thịt thái lát, cắt nhỏ hoặc thịt băm (<1% NaCl hoặc có gia vị) cần xử lý nhiệt trước khi ăn như làm gia vị, ướp muối, ướp các loại thảo mộc và gia vị, hoặc các thành phần khác để cải thiện đặc tính cảm quan hoặc cấu trúc của sản phẩm.

CHÚ THÍCH 6: Sản phẩm thịt gia cầm bao gồm thịt cắt miếng ướp muối và gia vị, thịt gà phi lê, cánh gà, nghĩa là cấu trúc nguyên vẹn có hoặc không có da.

CHÚ THÍCH 7: Hải sản bao gồm nhuyễn thể hai mảnh vỏ sống và các loài động vật chân bụng, da gai và hải sâm tương tự sống dưới biển.

CHÚ THÍCH 8: Thực phẩm ăn ngay (RTE): Thực phẩm do nhà sản xuất cung cấp cho người tiêu dùng trực tiếp mà không cần nấu hoặc chế biến tiếp để loại bỏ hoặc giảm vi sinh vật có liên quan đến mức chấp nhận được.

CHÚ THÍCH 9: Thực phẩm sẵn để nấu (RTC): Thực phẩm do nhà sản xuất tạo ra cần phải nấu hoặc chế biến hiệu quả để loại bỏ hoặc giảm vi sinh vật quan tâm đến mức chấp nhận được.

CHÚ THÍCH 10: Thực phẩm gia nhiệt lại (RTRH): Thực phẩm được nhà sản xuất tạo ra thích hợp để dùng trực tiếp mà không cần nấu, nhưng có thể làm ấm trước khi ăn.

CHÚ THÍCH 11: Đối với định nghĩa về thức ăn chăn nuôi, tham khảo Quy định (EC) No 79/373/EEC.^[9]

CHÚ THÍCH 12: Nước được đề cập ở Bảng A.1 là nước được sử dụng trong quá trình sản xuất hoặc cho PPS. Trong những trường hợp này, không cần lọc mẫu.

CHÚ THÍCH 13: Nếu cần thử nghiệm các cỡ mẫu cụ thể của một hạng mục, ví dụ 375 g thịt bò xay thì cần kiểm tra một quy trình kỹ thuật hoàn chỉnh trong nghiên cứu so sánh phương pháp cho trường hợp cụ thể này.

CHÚ THÍCH 14: Khi phương pháp cần được xác nhận đối với thức ăn công thức cho trẻ sơ sinh và/hoặc các loại ngũ cốc cho trẻ sơ sinh chứa probiotica, các sản phẩm có chứa probiotic cần được chọn và được xác nhận giá trị sử dụng là một nhóm đầy đủ.

CHÚ THÍCH 15: Nếu nghiên cứu nhắm đến các đơn vị hình thành bào tử thì bao gồm cả tế bào sinh dưỡng và các bào tử.

Phụ lục B

(Quy định)

Thứ tự ưu tiên sử dụng các mẫu nhiễm tự nhiên và nhân tạo trong các nghiên cứu xác nhận

Phụ lục này đưa ra thứ tự ưu tiên và thông tin về việc sử dụng các loại mẫu khác nhau trong cả hai nghiên cứu so sánh phương pháp và nghiên cứu liên phòng thử nghiệm.

Lựa chọn thứ nhất: Mẫu nhiễm tự nhiên

Mẫu lý tưởng là mẫu bị nhiễm tự nhiên có mức nhiễm sinh vật đích gần với mức phát hiện mong muốn.

Lựa chọn thứ 2: Nhiễm hỗn hợp

Nếu thấy mẫu nhiễm tự nhiên ở mức quá cao thì có thể làm giảm nồng độ xuống bằng cách "pha loãng" mẫu bị nhiễm tự nhiên với một mẫu tương tự có chứa hệ vi sinh vật nền bình thường. Mẫu hỗn hợp được tạo ra cần có sự phân bố đồng đều vi sinh vật đích.

Lựa chọn thứ 3: Mẫu gây nhiễm nhân tạo

Các chủng được sử dụng cho nuôi cấy nhân tạo phải được phân lập từ cùng một mặt hàng (hạng mục) và có tính đến tính đa dạng tự nhiên của sinh vật đích, ví dụ: typ huyết thanh, kiểu gen và kiểu hình.

Mức hệ vi sinh vật đích cần đại diện cho mẫu nhiễm tự nhiên thường gặp trong sản phẩm. Mặt hàng cần chứa một hệ vi sinh vật nền "bình thường".

Lựa chọn thứ 4: Mẫu chuẩn

Các mẫu chuẩn đã được chứng nhận có chứa mức vi sinh vật đích phù hợp, được xác định rõ ở trạng thái ổn định, nhưng trạng thái ức chế có thể được sử dụng để trộn vào mẫu khi phân tích cả bằng phương pháp định tính và định lượng. Đối với các nghiên cứu định tính, việc sử dụng các mẫu này cần hạn chế khi chỉ có một vài chủng hoặc typ huyết thanh của vi sinh vật đích có nguồn gốc từ thực phẩm sẵn có để làm mẫu chuẩn.

Phụ lục C

(Tham khảo)

Các quy trình chung để tạo mẫu nhiễm bằng cách trộn và gây nhiễm nhân tạo mẫu thực phẩm

C.1 Yêu cầu chung

Phụ lục này cung cấp các ví dụ về gây nhiễm nhân tạo các nền mẫu. Các phương pháp được các phòng thử nghiệm tổ chức sử dụng không giới hạn bởi các phương pháp được trình bày ở đây. Đối với việc gây nhiễm nhân tạo mẫu, có hai khả năng được đưa ra: đầu tiên mẫu gốc được đặt tên, mẫu thêm chuẩn được đặt tên khác. Các quy trình gốc dựa trên việc làm nhiễm các mẫu tự nhiên bằng chất cấy đã pha loãng và sau đó lưu trữ mẫu trong một khoảng thời gian dài để vi sinh vật thích ứng với các điều kiện môi trường của thực phẩm. Các quy trình thêm chuẩn được dựa trên việc áp dụng các điều kiện ức chế có liên quan chất cấy đã pha loãng và sau đó nuôi cấy các chủng cấy bị ức chế vào thực phẩm. Thông tin thêm về phương pháp luận thêm chuẩn được nêu trong Tài liệu tham khảo [10].

Các hướng dẫn đối với các mẫu môi trường (ví dụ: mẫu bề mặt) đã được AOAC công bố⁽⁶⁾ (xem các phần 4.1.3.11, 4.1.3.3 và 4.1.3.8.2 của các hướng dẫn).

C.2 Làm nhiễm bằng cách trộn

X g mẫu bị nhiễm tự nhiên được trộn lẫn với y g mẫu không nhiễm để đạt được mức nhiễm mong muốn.

Bảo quản mẫu thực phẩm trộn này ở nhiệt độ thích hợp cho loại thực phẩm đó. Để cho quần thể vi khuẩn cân bằng trong mẫu tối thiểu 1 ngày trước khi phân tích.

C.3 Quy trình gây nhiễm nhân tạo mẫu thực phẩm

CHÚ THÍCH: Trọng tâm của quy trình này là đạt được sự phục hồi từng phần.

C.3.1 Gây nhiễm nhân tạo mẫu thực phẩm có độ ẩm cao bằng dịch cấy vi sinh vật

Chuẩn bị gây nhiễm thực phẩm bằng một mẫu cấy vi sinh vật.

a) Chủng cấy đích: Nuôi cấy một ống canh thang tăng sinh không chọn lọc với chủng được chỉ định. Ủ canh thang này trong điều kiện cho chủng phát triển tối ưu. Đếm số lượng phát triển của chủng khởi động.

b) Điều chỉnh nhiệt độ vi khuẩn cách pha loãng: Sau khi ủ, pha loãng chủng khởi động trong dịch pha loãng phù hợp để đạt được mức gây nhiễm thực phẩm mong muốn. Mức pha loãng cần thiết phụ thuộc vào loại thực phẩm cần được nuôi cấy, chủng được chọn, mức nhiễm dự kiến, mức vi sinh vật nền dự kiến và điều kiện bảo quản của loại thực phẩm.

c) Ưc chế nhiệt: Các chủng được sử dụng để cấy vào thực phẩm có gia nhiệt trong quá trình chế biến cần được ực chế nhiệt, ví dụ: ở 50 °C trong 15 min, trước khi nuôi cấy vào thực phẩm.

d) Cấy vào thực phẩm: Dùng pipet lấy một thể tích đã biết hoặc phun một thể tích đã biết của dịch cấy ở độ pha loãng đã chọn vào thực phẩm. Có thể cấy các mẫu riêng lẻ. Ngoài ra, có thể trộn đều thực phẩm sau khi cấy để đồng nhất. Lượng dịch chất cấy càng ít càng tốt vì nó sẽ ảnh hưởng không đáng kể đến hoạt độ nước (a_w). Nhìn chung, thường dùng 0,25 ml/25 g mẫu (1 %).

e) Trộn đều: Sau khi cấy, thực phẩm được trộn đều để đảm bảo tính đồng nhất. Nếu dịch cấy được thêm làm nhiều bước, cần trộn đều sau mỗi bước.

f) Ổn định mẫu/ức chế: Giữ thực phẩm ở nhiệt độ bảo quản thông thường của thực phẩm đó. Xem xét đến khả năng phát triển hoặc khả năng sống của sinh vật trong thời gian lưu giữ này. Liên quan đến các nhiệt độ bảo quản khác nhau, bảo quản thực phẩm đã cấy trong thời gian tối thiểu như dưới đây:

1) Thực phẩm đông lạnh: Ít nhất 2 tuần ở -20 °C;

2) Thực phẩm bảo quản lạnh: Ít nhất 48 h ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C;

3) Thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ phòng: Ít nhất 2 tuần ở 20 °C đến 25 °C.

VÍ DỤ: Thịt của các loại hạt được bảo quản ở nhiệt độ phòng, nước cam được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C và kem lạnh thực phẩm được bảo quản ở -20 °C.

g) Kiểm tra xác nhận mức gây nhiễm: Nếu cần, kiểm tra mức nuôi cấy sau khi các mẫu được bảo quản trong thời gian ổn định thích hợp. Nếu cần, chỉnh các mức nhiễm để đảm bảo rằng đã đạt được mức gây nhiễm mong muốn.

C.3.2 Gây nhiễm nhân tạo thực phẩm có độ ẩm thấp với chủng vi sinh vật đông khô

a) Chuẩn bị chủng cấy đông khô: Cấy chủng được chỉ định vào ống đựng canh thang tăng sinh không chọn lọc. Ủ canh thang ở điều kiện cho chủng phát triển tối ưu. Sau khi ủ, thu lấy các tế bào vi khuẩn bằng cách ly tâm. Rửa các tế bào hai lần bằng dung dịch đệm pha loãng vô trùng. Ly tâm và gạn tách lớp nổi phía trên. Huyền phù lại phần sinh khối tế bào vi khuẩn trong NFDM 10 % vô trùng (sữa khô không béo). Chuyển huyền phù tế bào vào các vật chứa thích hợp để làm đông khô.

b) Đánh giá mức sinh vật đích: Thu lấy các huyền phù tế bào đông khô vào trong vật chứa vô trùng. Nghiền thủ công chủng cấy đông khô để thu được bột mịn đồng nhất trước khi đánh giá mức gây nhiễm.

Sử dụng phương pháp không chọn lọc để xác định mức độ gây nhiễm và ủ các đĩa trong các điều kiện phát triển tối ưu.

c) Cấy chủng đông khô vào mẫu thực phẩm để thu được mức yêu cầu: Trộn 0,1 g chủng cấy đông khô với 10 g thực phẩm chưa cấy, ví dụ: trong túi chất dẻo vô trùng. Lắc túi cho đến khi chủng cấy được phân bố đều trong mẫu thực phẩm. Từ mẫu ban đầu này, chuẩn bị dây mẫu thực phẩm có nồng độ chủng đông khô giảm 10 lần (ví dụ: 1 g mẫu ban đầu + 9 g thực phẩm cùng loại .v.v...) đến mức thích hợp. Đảm bảo trộn kỹ ở mỗi mức pha loãng.

d) Lưu giữ thực phẩm ở nhiệt độ bảo quản thích hợp (tốt nhất là nhiệt độ bảo quản thông thường). Để cho quần thể vi khuẩn cân bằng trong thực phẩm cần ít nhất hai tuần trước khi phân tích.

e) Kiểm tra xác nhận mức gây nhiễm: Nếu cần, kiểm tra mức nuôi cấy sau khi các mẫu được lưu giữ trong thời gian thích hợp.

C.4 Quy trình gây nhiễm nhân tạo mẫu thực phẩm sử dụng quy trình thêm chuẩn

Các quy trình thêm chuẩn với các bước khác nhau như dưới đây.

a) Cấy chủng đích: Cấy chủng được chỉ định vào ống canh thang tăng sinh không chọn lọc. Ủ canh ở điều kiện tối ưu cho chủng phát triển.

b) Điều chỉnh mức pha loãng: Sau khi ủ, pha loãng, cấy trong dịch pha loãng thích hợp cho đến khi đạt nhiệt độ yêu cầu. Các quy trình ức chế thường được thực hiện trên các chủng cấy thuần với 10^4 đến 10^5 tế bào/ml.

c) Áp dụng quy trình ức chế: Áp dụng biện pháp xử lý chủng cấy thích hợp như trong các ví dụ dưới đây.

VÍ DỤ 1: Xử lý nhiệt (ví dụ, 15 min ở 50 °C) bằng cách ngâm trong bể ở nhiệt độ đã cho.

VÍ DỤ 2: Xử lý đông lạnh (ví dụ, 72 h ở -20 °C).

VÍ DỤ 3: Xử lý hóa chất (ví dụ, xử lý ở nồng độ muối cao hoặc ở pH thấp).

VÍ DỤ 4: Bảo quản ở 4 °C (ví dụ, tối thiểu một tuần).

Các điều kiện áp dụng ức chế mạnh phụ thuộc vào loại vi sinh vật và thậm chí là chủng được chọn. Quy trình ức chế được chọn cần giống như ức chế vi sinh vật được tìm thấy trong mẫu thực phẩm được sử dụng để thêm chuẩn.

d) Đánh giá ức chế: Hiệu quả ức chế thường được đánh giá bằng cách định lượng chủng cấy thuần trên thạch chọn lọc và không chọn lọc. Chênh lệch trên 0,5 log₁₀ cfu/ml được dự kiến là áp dụng ức chế hiệu quả.

TCVN 12365-2:2018

e) Điều chỉnh mức chủng cấy: Pha loãng chủng cấy, nếu cần trong dịch pha loãng thích hợp cho đến khi đạt được mức yêu cầu để cấy vào thực phẩm. Đối với các phương pháp định tính, mức này phải là mức phát hiện của phương pháp.

f) Cấy vào thực phẩm chủng cấy pha loãng bằng cách dùng pipet lấy một thể tích đã biết hoặc phun một thể tích đã biết. Chủng cấy pha loãng được cấy vào mẫu bằng cách phun hoặc sử dụng pipet. Việc cấy các mẫu đơn lẻ được chọn nhiều hơn. Thể tích chủng cấy càng nhỏ càng tốt vì sẽ không ảnh hưởng nhiều đến hoạt độ nước. Thông thường, sử dụng 0,25 ml/25 g mẫu.

g) Trộn để đảm bảo tính đồng nhất: Sau khi nuôi cấy, mẫu được trộn đều để đảm bảo tính đồng nhất. Nếu chủng cấy được thêm vào theo nhiều bước thì trộn đều sau mỗi bước thêm.

Phụ lục D

(Tham khảo)

Các mô hình tính RLOD

sử dụng dữ liệu từ nghiên cứu so sánh phương pháp

D.1 Yêu cầu chung

Giới hạn phát hiện (LOD) là mức nhiễm thấp nhất phát hiện được với độ tin cậy dự kiến. Trong tiêu chuẩn này, sử dụng LOD_{50} với mức nhiễm dự kiến 50 % kết quả dương tính. Mức phát hiện tương đối (RLOD) là tỷ lệ LOD của phương pháp thay thế và LOD của phương pháp chuẩn. Như vậy, phép đo này không phụ thuộc vào mức kết quả thử nghiệm dương tính đã chọn.

Bảng D.1 đưa ra ví dụ về dữ liệu được sử dụng để tính LOD và RLOD: mức nhiễm, số lượng các phép thử được thực hiện, số kết quả dương tính đối với phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế. Số lượng các kết quả dương tính được mô tả bằng phân bố nhị thức. Số lượng CFU có mặt trong các phần mẫu thử được phân tích (theo lý thuyết) được mô tả bằng phân bố Poisson.

Bảng D.1 – Ví dụ về dữ liệu sử dụng để tính LOD và RLOD

Nhóm	Mức	x (cfu/g)	n_{tot}	$n_{pos\ ref}$	$n_{pos\ alt}$
Sữa và sản phẩm sữa	1	0	5	0	0
Sữa và sản phẩm sữa	2	0,022 4	20	12	10
Sữa và sản phẩm sữa	3	0,037 33	5	5	5

LOD và RLOD được tính từ dữ liệu bằng cách liên kết các quan sát phân bố nhị thức với số phân bố Poisson của CFU trong các phần mẫu thử bằng cách áp dụng Mô hình tuyến tính tổng quát (GLM). Để biết thông tin chung về GLM, xem Tài liệu tham khảo [11]. Cụ thể hơn, mô hình được sử dụng là một mô hình log-log bổ sung (CLL).

d là mức nhiễm tính bằng CFU trên một đơn vị khối lượng hoặc thể tích (ví dụ: CFU/g) và p là xác suất thu được kết quả dương tính: $p = E(n_{pos}/n_{tot})$

Bằng cách áp dụng hàm liên kết phi tuyến tính sau, p được chuyển thành tham số η có thể dự đoán tuyến tính từ $\ln d$ (logarit của nhiễm): $\eta = \ln[-\ln(1-p)]$.

Ngoài chức năng liên kết, hàm dự báo tuyến tính được sử dụng mô hình η như hàm của $\ln d$. Để tính LOD và RLOD, sử dụng các mô hình khác nhau. Các mô hình này có thể được trang bị trong các gói phần mềm thống kê. Với mục đích của tiêu chuẩn này, các chương trình cụ thể dựa trên Excel® được tạo sẵn để tính LOD và RLOD.

D.2 Các mức nhiễm chưa biết

Khi chưa biết được mức nhiễm, chỉ có thể ước tính trực tiếp RLOD. Tùy chọn này được quy định trong 5.1.4.2. Không thu được thông tin về LOD. Trong trường hợp này, sử dụng hàm dự báo sau:
 $\eta = a_0 + L_i + D$.

Các thông số L_i được ước tính phù hợp cho mức nhiễm của mẫu. RLOD được tính theo cùng một cách: $RLOD = \exp(-D)$.

Các chi tiết của mô hình được trình bày trong Tài liệu tham khảo [15] và Tài liệu tham khảo [16]. Trong tiêu chuẩn này, rất hạn chế bố trí phép thử để ước tính RLOD. Việc bổ sung các thông số phù hợp trong phương pháp này với độ tin cậy ước tính của RLOD.

D.3 Các mức nhiễm đã biết, ước lượng RLOD thông qua LOD

Khi mức nhiễm (xấp xỉ) đã biết, RLOD có thể được ước tính trực tiếp hoặc thông qua các LOD của phương pháp thay thế và phương pháp chuẩn. Trong trường hợp phương pháp chuẩn, đối với mỗi nhóm LOD được ước tính bằng cách tính RLOD: $RLOD = \frac{LOD_{th}}{LOD_{ref}}$

Mô hình hoặc hàm dự đoán được sử dụng để ước tính LOD là: $\eta = a_0 + \hat{\eta} + \ln d$

Trong đó:

$a_0 = \ln A_0$ (A_0 là cỡ mẫu tính bằng g hoặc ml);

$\hat{\eta} = \ln F_j$ (F_j hiệu ứng nhóm của nhóm thứ j);

d = mức nhiễm (cfu/g hoặc cfu/ml).

Các chi tiết của mô hình được nêu trong Tài liệu tham khảo [15] và Tài liệu tham khảo [16].

LOD được ước tính như sau: $LOD = \frac{\ln(1-p)}{A_0 \hat{F}}$

Với $p = 0,5$ (vì LOD_{50} được xác định). \hat{F} thu được từ Công thức sau:

$$\sum_{j=1}^q \left(\frac{y_j d_j}{\exp(A_0 \hat{F} d_j) - 1} - (n_j - y_j) d_j \right) = 0 \quad (D.1)$$

Phương pháp tính RLOD thông qua LOD cho phép đánh giá các đặc tính hiệu năng LOD của phương pháp thay thế.

Phụ lục E

(Quy định)

Các điểm cần lưu ý khi chọn chủng cho các phép thử mục tiêu và loại trừ

E.1 Yêu cầu chung

Phụ lục này đưa ra các yêu cầu thử nghiệm tối thiểu để sử dụng chung. Việc lựa chọn các chủng thử nghiệm, phần lớn phải có nguồn gốc từ các nhóm được thử nghiệm trong nghiên cứu và bao gồm các tính chất đã được công nhận của chủng đích như: đặc điểm nhận biết đa dạng, ví dụ sinh hóa, typ huyết thanh, typ thực khuẩn thể, phân bố địa lý và bất cứ yêu cầu nào khác của các nhà xây dựng phương pháp thay thế.

E.2 Phân loại nhóm đích

- a) Nhóm chưa định danh, ví dụ: vi khuẩn tổng số, coliform, nấm men và vi khuẩn lactic.
- b) Họ, ví dụ: Enterobacteriaceae.
- c) Chi, ví dụ: *Salmonella*, *Pseudomonas* và *Listeria*.
- d) Loài, ví dụ: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli*.
- e) Typ huyết thanh hoặc typ thực khuẩn thể, ví dụ: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.

E.3 Chọn nhóm đích trong nghiên cứu mục tiêu

- a) Đối với các nhóm chưa định danh, nhóm đích được xác định bằng phương pháp chuẩn, các chủng được sử dụng phải được chọn từ các nhóm có khả năng phát triển điển hình theo phương pháp chuẩn.
- b) Đối với họ: Sử dụng các chủng từ một loạt các chi trong họ và nếu có thể, bao gồm một thành viên đại diện của tất cả các chi trong họ.
- c) Đối với chi: Sử dụng một loạt chủng của các loài từ chi này và nếu có thể, thử nghiệm càng nhiều loài càng tốt trong chi.
- d) Đối với loài: Chọn một loạt chủng từ loài đó. Đối lựa chọn chủng, phải xem xét cận kề hơn nhiều chi tiết phụ khác. Ví dụ: *Salmonella* và *Listeria* được phân typ huyết thanh (typ huyết thanh) và kiểu thực khuẩn thể. Sau này, chọn theo các phương pháp kiểu khác (di truyền) có thể thích hợp. Khi xác định các chủng dương tính, các phòng thử nghiệm tổ chức phải sử dụng các thông tin cập nhật sẵn có để đảm bảo rằng các chủng có liên quan đến các nhóm đích tại thời điểm thử nghiệm.

e) Đối với các chủng huyết thanh hoặc kiểu thực khuẩn thể đặc trưng: Một loạt các nguồn của typ huyết thanh hoặc thực thể.

E.4 Chọn các nhóm không phải đích trong nghiên cứu loại trừ

a) Các nhóm không phải đích (nghĩa là các nhóm dự kiến âm tính và được sử dụng cho các thử nghiệm phản ứng chéo) cần được quy định theo nhóm đích.

b) Khi nhóm đích là họ: Các chủng không phải đích phải bao gồm các họ có quan hệ mật thiết khác.

c) Khi nhóm đích là chi: Các chủng không phải đích phải bao gồm các chi khác được coi là tương tự về sinh hóa hoặc di truyền học với chi đích.

d) Khi nhóm đích là loài: Các chủng không phải đích phải bao gồm các loài khác trong chi đích.

e) Khi nhóm đối tượng đích là typ huyết thanh hoặc thực khuẩn thể đặc trưng: Các chủng không phải đích phải bao gồm các chủng huyết thanh hoặc thực khuẩn thể khác trong cùng một loài.

Phụ lục F

(Tham khảo)

**Các xem xét để tính mức phát hiện tương đối (RLOD) giữa các phòng thử nghiệm
thu được trong nghiên cứu liên phòng**

Mức phát hiện tương đối (RLOD) được ước tính trong nghiên cứu liên phòng sử dụng các mô hình thống kê tương tự như trong nghiên cứu so sánh phương pháp (nghiên cứu RLOD, xem Phụ lục D). Trong trường hợp nghiên cứu liên phòng, điều này được điều tra xem có sự khác biệt giữa các phòng thử nghiệm hay không.

Số lượng mẫu dương tính được mô tả bằng phân bố nhị thức. Phần các mẫu dương tính dự kiến $[P = E(n_{\text{pos}}/n_{\text{tot}})]$ được liên kết với số lượng cfu trong mẫu bằng p ($P = 1 - e^{-\lambda}$) và sử dụng thêm mô hình z [$z = \ln(\lambda)$]. Điều này hàm ý mối quan hệ log-log bổ sung giữa z và p : $z = \ln(\lambda) = \ln[-\ln(1-p)]$. Việc tùy chọn phân bố nhị thức và hàm liên kết log-log (CLL) bổ sung, có thể được quy định như các đầu vào trong mô hình tuyến tính tổng quát có sẵn trong tất cả các gói thống kê chính.

Các mô hình thích hợp như sau:

$$z = \ln(s.x) + D \quad (F.1)$$

$$z = \ln(s.x) + D + \text{Lab}_j \quad (F.2)$$

Trong đó:

s là lượng mẫu (ví dụ: bằng g hoặc ml);

x là mức nhiễm của mẫu (cfu/g hoặc cfu/ml);

D là chênh lệch giữa các phương pháp thay thế và phương pháp chuẩn trên thang đo z (thang đo mức log), trung bình của các phòng thử nghiệm;

Lab_j là độ lệch hệ thống đối với phương pháp phòng thử nghiệm thứ j ở thang đo z (thang đo mức log), trung bình của phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế. Các hiệu ứng phòng thử nghiệm được mô phỏng đơn giản nhất như là các hiệu ứng cố định trong mô hình CLL (xem 5.1.4.2 và Phụ lục D để giải thích thêm về mô hình CLL).

Các tham số D và Lab_j được ước lượng bằng cách điều chỉnh mô hình CLL vào dữ liệu kết hợp. Phép thử thống kê được thực hiện để điều tra chênh lệch trong phòng thử nghiệm. Nếu những điều này không có ý nghĩa thống kê thì mô hình đơn giản hơn được sử dụng để ước lượng RLOD; khác mô hình bao gồm các hiệu ứng phòng thử nghiệm được sử dụng.

Đối với cả hai loại mô hình, RLOD được tính như là e^{-D} , trong đó D là tham số ước tính.

Trong mọi trường hợp, khoảng tin cậy 90 % [$RLOD_{low}$, $RLOD_{upp}$] đối với $RLOD$ tạo thành tính được, ví dụ: $[e^{-D+se(D)}, e^{-D+se(D)}]$

Trong đó:

$se(D)$ là sai số chuẩn xấp xỉ của ước tính D ;

df là bậc tự do của mô hình được điều chỉnh;

$t_{\alpha}(0,95)$ là giá trị tới hạn 95 % một mặt của phân bố t -Student với df bậc tự do.

Một bộ dữ liệu ví dụ về các phép tính liên quan đến việc xác nhận giá trị sử dụng tại 10 phòng thử nghiệm của phương pháp thay thế đối với *Listeria innocua* trong sữa ở ba mức nhiễm. Giới hạn chấp nhận giả định $AL = 4$. Để phân tích thống kê, dữ liệu được sắp xếp theo mức/phương pháp/phòng thử nghiệm kết hợp trong bộ dữ liệu với 60 hàng (ba cấp x hai phương pháp x 10 phòng thử nghiệm) (Bảng F.1).

Bảng F.1 – Ví dụ về một bộ dữ liệu từ một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Mức (cfu/25 ml)	Phương pháp	Phòng thử nghiệm	n_{pos}	n_{tested}	Phương pháp	Phòng thử nghiệm	n_{pos}	n_{tested}
0	Chuẩn	A	0	8	Thay thế	A	0	8
0	Chuẩn	B	0	8	Thay thế	B	0	8
0	Chuẩn	D	0	8	Thay thế	D	0	8
0	Chuẩn	F	0	8	Thay thế	F	0	8
0	Chuẩn	G	0	8	Thay thế	G	0	8
0	Chuẩn	H	0	8	Thay thế	H	0	8
0	Chuẩn	I	0	8	Thay thế	J	0	8
0	Chuẩn	L	0	8	Thay thế	L	0	8
0	Chuẩn	M	0	8	Thay thế	M	0	8
0	Chuẩn	O	0	8	Thay thế	O	0	8
2,4	Chuẩn	A	8	8	Thay thế	A	8	8
2,4	Chuẩn	B	6	8	Thay thế	B	8	8
2,4	Chuẩn	D	7	8	Thay thế	D	6	8
2,4	Chuẩn	F	8	8	Thay thế	F	7	8
2,4	Chuẩn	G	7	8	Thay thế	G	8	8
2,4	Chuẩn	H	5	8	Thay thế	H	7	8
2,4	Chuẩn	J	6	8	Thay thế	J	5	8
2,4	Chuẩn	L	7	8	Thay thế	L	5	8
2,4	Chuẩn	M	6	8	Thay thế	M	7	8
2,4	Chuẩn	O	7	8	Thay thế	O	6	8
25,3	Chuẩn	A	8	8	Thay thế	A	8	8
25,3	Chuẩn	B	8	8	Thay thế	B	8	8
25,3	Chuẩn	D	8	8	Thay thế	D	8	8
25,3	Chuẩn	F	8	8	Thay thế	F	8	8
25,3	Chuẩn	G	8	8	Thay thế	G	8	8
25,3	Chuẩn	H	8	8	Thay thế	H	8	8
25,3	Chuẩn	I	8	8	Thay thế	I	8	8
25,3	Chuẩn	L	8	8	Thay thế	L	8	8
25,3	Chuẩn	M	8	8	Thay thế	M	8	8
25,3	Chuẩn	O	8	8	Thay thế	O	8	8

Trước khi khớp dữ liệu, các phần không có nhiều thông tin của bộ dữ liệu bị xóa. Trong trường hợp này, tất cả các kết quả từ các phòng thử nghiệm A và F không có kết quả phân đoạn cho mức bất kỳ được loại ra.

Các dữ liệu còn lại đã được phân tích bằng cách nhập dữ liệu mô hình CLL (xem Phụ lục D) như là một mô hình tuyến tính tổng quát (GLM). Các thuật toán đối với GLM có sẵn trong tất cả các gói phần mềm thống kê chính. Đối với ví dụ này, GenStat đã được sử dụng. Xem Tài liệu tham khảo [11] để biết thông tin chung về GLM.

Lập mô hình CLL bao gồm các hiệu ứng phòng thử nghiệm với dữ liệu kết hợp từ ba mẫu và tám phòng thử nghiệm (trừ phòng thử nghiệm A và F), các hiệu ứng phòng thử nghiệm Labj đối với phòng thử nghiệm D, G, H, J, L, M và O thể hiện sự chênh lệch với phòng thử nghiệm B được tìm thấy là 0,39; 0,39; -0,34; -0,17; 0,39; 0,00; và 0,39 tương ứng (tất cả các số chuẩn 0,44). Những chênh lệch phòng thử nghiệm này không có ý nghĩa thống kê trong phân tích thử nghiệm sai lệch (giảm độ lệch 6,37 với bảy bậc tự do, giá trị trung bình khi bình phương gần đúng p 0,50). Do đó, mô hình CLL không có các hiệu ứng phòng thử nghiệm đã được điều chỉnh thích hợp để ước tính chênh lệch của phương pháp D bằng -0,046 5 (sai số chuẩn 0,22). RLOD sau đó được ước tính là $\exp[-(-0,046\ 5)] = 1,05$ với khoảng tin cậy 90 % là 0,73 -1,51.

Do đó, phương pháp thay thế chỉ có độ đáp ứng hơi ít hơn (LOD cao hơn 5%) so với phương pháp chuẩn (do chỉ có một kết quả dương tính đối với mẫu ở mức trung bình trong phòng thử nghiệm J). Đây không phải là chênh lệch đáng kể vì từ thực tế là khoảng tin cậy bao gồm một giá trị và từ việc phân tích của thử nghiệm sai lệch (giảm 0,04 độ lệch với một bậc tự do, giá trị khi bình phương gần đúng p 0,83). Về xác nhận giá trị sử dụng, phương pháp thay thế sẽ được xác nhận hợp lệ với mọi giới hạn chấp nhận (AL) xuống đến 1,6.

Phụ lục G

(Tham khảo)

Quy trình của độ chính xác để xác nhận giá trị sử dụng các mô hình định lượng

G.1 Tiêu chí chấp nhận

Chiến lược xác nhận giá trị sử dụng đối với các phương pháp định lượng dựa trên ý tưởng rằng người dùng cuối cùng và người quyết định thực sự yêu cầu một quy trình phân tích cho kết quả Z khác với giá trị chỉ định của mẫu X ít hơn một tiêu chí chấp nhận được là λ . Điều này nên được hiểu như là một mục tiêu phù hợp với mục đích. Yêu cầu này có thể được biểu thị bằng công thức sau:

$$|Z - X| < \lambda \quad (G.1)$$

Tiêu chí A thể hiện sự gần đúng của sự thống nhất giữa giá trị đã định và kết quả thu được là có thể chấp nhận được. Phương pháp tạo ra một tỷ lệ lớn các kết quả có thể chấp nhận được là có giá trị đối với người ra quyết định và có thể được cho là phù hợp với mục đích. Như vậy, giá trị chấp nhận được λ phụ thuộc vào mục tiêu của quy trình phân tích. Điều này có thể đạt được bằng sự đồng thuận giữa nhà phân tích và người sử dụng cuối hoặc bằng cách sử dụng các quy định. Trong khuôn khổ của tiêu chuẩn này, các giới hạn chấp nhận được thu được bằng sự đồng thuận giữa các bên liên quan và được tính bằng các đơn vị \log_{10} .

G.2 Giá trị chuẩn được chỉ định

Khi phân tích các mẫu, các giá trị chính xác chưa được biết. Tuy nhiên, khi xác nhận giá trị sử dụng phương pháp, giá định rằng một giá trị có thể được chỉ định đầy đủ cho vật liệu sử dụng để đánh giá hiệu lực của phương pháp. Điều này thường được thực hiện bằng cách sử dụng mẫu chuẩn (đã được chứng nhận), nhưng điều này hầu như không có trong vi sinh học. Trong khuôn khổ của cách tiếp cận độ chính xác, giá trị được chỉ định của mẫu là giá trị thu được bằng phương pháp chuẩn.

Giá trị chuẩn được chỉ định có thể được lấy từ một phép đo đơn lẻ hoặc từ các phép đo lặp lại (trung bình).

Khi giải thích dữ liệu xác nhận giá trị sử dụng trong khuôn khổ của tiêu chuẩn này, giá trị chuẩn được chỉ định là một hằng số, mặc dù nó được ước lượng từ dữ liệu thực nghiệm.

G.3 Khoảng dung sai

Để ra quyết định, liệu phương pháp thay thế có hợp lệ hay không, cần xác minh xem liệu phương pháp thay thế có thể tạo ra một tỷ lệ lớn các kết quả chấp nhận được tính theo trung bình hay không. Vì

không phải dễ dàng để tính tỷ lệ này trực tiếp đối với giới hạn có thể chấp nhận được đã nêu, khi đó sử dụng phương pháp gián tiếp. Điều này bao gồm việc tính khoảng dung sai (β -ETI) có chứa trung bình tỷ lệ β % kết quả và để kiểm tra xác nhận rằng β -ETI được bao gồm trong giới hạn chấp nhận được. Điều này có thể được dịch sang công thức sau:

$$\text{Prob} (|Z - X|) < \lambda \geq \beta \quad (\text{G.2})$$

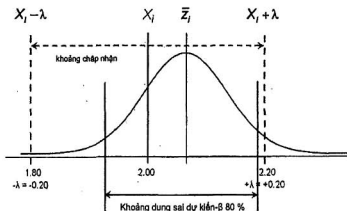
Không nhầm lẫn khoảng dung sai β dự kiến với khoảng tin cậy được sử dụng để xác định khoảng mà giá trị chuẩn được chỉ định của thống số thống kê được giả định là nằm ở mức tin cậy nhất định (thường là 95 %).

G.4 Quy trình về độ chính xác

Các mẫu được sử dụng trong các nghiên cứu xác nhận giá trị sử dụng được chọn để bao trùm toàn bộ dải ứng dụng mong muốn và có các mức nhiễm khác nhau. Các β -ETI khác nhau được tính từ các phép đo thực nghiệm được thực hiện trên mỗi bộ mẫu, các giá trị chuẩn sẽ được biết. Thực sự, β -ETI là các khoảng mà dự kiến sẽ có một tỷ lệ β trong số các phép đo trong tương lai sẽ nằm trong đó.

Do đó, đối với một mức nhiễm nhất định, miễn là β -ETI được bao gồm trong giới hạn chấp nhận, thì các điều kiện đối với phương pháp phân tích đánh giá được đáp ứng đầy đủ.

Dữ liệu được giải thích, dựa trên đồ thị của β -ETI và các giới hạn có thể chấp nhận được như minh họa trong hình G.1 đối với một bộ mẫu (ví dụ: các mẫu từ cùng một nhóm hoặc một kiểu/loại).



Hình G.1 – Biểu thị đồng thời khoảng chấp nhận và β -ETI đối với một mẫu mặt hàng xác nhận giá trị sử dụng riêng lẻ

Phụ lục H
(Tham khảo)

Áp dụng độ chính xác trong nghiên cứu so sánh phương pháp

Một phương pháp thay thế đếm *E. coli* trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi đã được xác nhận giá trị sử dụng cho các nhóm khác nhau. Trong phụ lục này, chỉ các kết quả thu được cho nhóm thức ăn cho động vật cảnh và thức ăn chăn nuôi. Các nhóm khác yêu cầu đánh giá tương tự.

Theo thiết kế thử nghiệm, sáu mẫu khác nhau của ba mức nhiễm khác nhau đã được kiểm tra. Đối với mỗi mẫu, lặp lại năm lần thử thực hiện với phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế. Bảng H.1 tóm tắt các kết quả thu được và các phép tính. Các bước và các ký hiệu đề cập đến trong 6.1.3.3.

Bảng H.1 – Tổng quan các kết quả và tính toán

Số đếm	Lặp lại	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 4	Mẫu 5	Mẫu 6
Chuẩn	1	40	210	350	520	4 500	3 600
	2	55	90	470	410	4 800	7 900
	3	80	320	500	680	7 900	5 500
	4	90	100	480	310	3 800	5 900
	5	50	130	490	590	4100	8 700
So sánh	1	100	90	890	430	9100	7 800
	2	60	25	810	510	2 400	9100
	3	70	60	460	480	3 700	6 000
	4	85	50	520	520	3 400	6100
	5	45	65	580	580	7 800	6 000
Chuyển đổi sang log₁₀							
Chuẩn	1	1,60	2,32	2,54	2,72	3,65	3,56
	2	1,74	1,95	2,67	2,61	3,68	3,90
	3	1,90	2,51	2,70	2,82	3,90	3,74
	4	1,95	2,00	2,68	2,49	3,58	3,77
	5	1,70	2,11	2,69	2,77	3,61	3,94
Bước 1	X _i	1,740	2,114	2,681	2,716	3,653	3,771

Bảng H.1 (kết thúc)

Số đếm	Lập lại	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 4	Mẫu 5	Mẫu 6
Thay thế	1	2,00	1,95	2,95	2,63	3,96	3,89
	2	1,78	1,4	2,91	2,71	3,38	3,96
	3	1,85	1,78	2,66	2,68	3,57	3,78
	4	1,93	1,7	2,72	2,72	3,53	3,79
	5	1,65	1,81	2,76	2,76	3,89	3,78
Bước 2	Y_i	1,845	1,778	2,763	2,708	3,568	3,785
Bước 3	$S_{ref,i}$	0,134	0,207	0,124	0,048	0,248	0,083
	N	5	5	5	5	5	5
Bước 4	S_{alt}	0,156					
Step 5	$S_{ref,i}$	0,146	0,231	0,064	0,131	0,125	0,151
	S_{ref}	0,150					
Bước 6	$Y_i - X_i$	0,105	-0,336	0,082	-0,008	-0,085	0,014
Bước 7	$S_{alt} \cdot \sqrt{1 + 1/n}$	0,171					
	$T(0,10; 24)^*$	1,318					
	$T.s. \sqrt{\quad}$	0,225					
	U_i	0,330	-0,111	0,307	0,217	0,140	0,240
	L_i	-0,120	-0,561	-0,143	-0,234	-0,310	-0,211

* Giá trị β -ETI được tính cho $\beta = 80\%$. Kết quả: $T_{\left(\frac{1-\beta}{2}\right); q(n-1)} = T_{(0,10); 24} = 1,318$.

Công thức Excel $TINV$ (phân bố t-student chuyển đổi), được sử dụng trong bản Excel chuẩn trong tiêu chuẩn này, chuyển thành một giá trị t-hai đuôi. Do vậy, hàm $TINV$ được sử dụng theo công thức của Bảng H.1: $TINV((1-\beta); q(n-1)) = TINV(0,20; 24) = 1,318$.

Bước 8: Lập bảng các giá trị thống kê tính được cho từng mẫu của nhóm.

Bảng H.2 – Trình bày các kết quả thống kê của nghiên cứu so sánh cho loại thức ăn cho động vật cảnh

Mẫu	Giá trị trung tâm (Ref)	Giá trị trung tâm (Alt)	Độ lệch	P-ETI trên	P-ETI dưới	AL trên	AL dưới
Mẫu 1	1,740	1,845	0,105	0,330	-0,120	0,5	-0,5
Mẫu 2	2,114	1,778	-0,336	-0,111	-0,561	0,5	-0,5
Mẫu 3	2,681	2,763	0,082	0,307	-0,143	0,5	-0,5
Mẫu 4	2,716	2,708	-0,008	0,217	-0,234	0,5	-0,5
Mẫu 5	3,653	3,568	-0,085	0,140	-0,310	0,5	-0,5
Mẫu 6	3,771	3,785	0,014	0,240	-0,211	0,5	-0,5

Quan sát thấy rằng đối với mẫu 2, giới hạn β -ETI L_1 vượt quá giới hạn chấp nhận được $AL = 0,5$ log đơn vị.

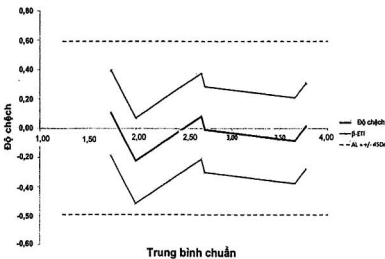
Vi một khoảng dung sai vượt quá giới hạn chấp nhận được, nên cần đánh giá bổ sung theo các bước trong 6.1.3.3.

Bước 9: Các giới hạn chấp nhận thay thế được tính là: $AL_s = 4 \cdot s_{ref} = 4 \cdot 0,15 = 0,6$. So sánh cho thấy rằng các giới hạn β -ETI U_i và L_i của bước 7 không vượt quá Giới hạn chấp nhận mới $\pm AL_s$. Phương pháp thay thế được chấp nhận là tương đương với phương pháp chuẩn cho việc kết hợp này của nhóm thực phẩm và kiểu/loại thực phẩm. Các kết quả thống kê cuối cùng được nêu trong Bảng H.3.

Bảng H.3 – Trình bày các kết quả thống kê của nghiên cứu so sánh đối với nhóm thức ăn cho động vật cảnh

Mẫu	Giá trị trung tâm (Ref)	Giá trị trung tâm (Alt)	Độ chệch	P-ETI trên	P-ETI dưới	AL trên	AL dưới
Mẫu 1	1,74	1,85	0,11	0,401	-0,181	0,6	-0,6
Mẫu 2	2,0	1,78	-0,22	0,071	-0,511	0,6	-0,6
Mẫu 3	2,68	2,76	0,08	0,371	-0,211	0,6	-0,6
Mẫu 4	2,72	2,71	-0,01	0,281	-0,301	0,6	-0,6
Mẫu 5	3,65	3,57	-0,08	0,211	-0,371	0,6	-0,6
Mẫu 6	3,77	3,79	0,02	0,311	-0,271	0,6	-0,6

Sau đó, dựng đồ thị về độ chính xác cuối cùng.



Hình H.1 – Độ chính xác cuối cùng đối với nhóm thức ăn cho động vật cảnh

Phụ lục I

(Tham khảo)

Ví dụ về việc áp dụng độ chính xác đối với nghiên cứu liên phòng

Một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm đã được tổ chức để xác nhận giá trị sử dụng phương pháp định lượng thay thế so với phương pháp chuẩn. Trong nghiên cứu này, ba mẫu có mức nhiễm danh nghĩa đã được chuẩn bị ở khoảng 150 cfu/g, 1 500 cfu/g và 15 000 cfu/g. Các mẫu được mã hóa thấp, trung bình và cao tương ứng. Một nhóm tám phòng thử nghiệm đã tham gia nghiên cứu này và được mã hoá từ một đến tám. Mỗi phòng nhận được các mẫu để phân tích lặp lại với phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế, nghĩa là tổng bốn phép đo tại mỗi mức.

Nghiên cứu liên phòng đã được tổ chức theo 6.2.2 của tiêu chuẩn này. Bên cạnh ba mức nhiễm, cũng kèm theo phép kiểm chứng âm tính. Những kết quả này không được nêu trong ví dụ này. Sau khi nhận được kết quả từ các cộng tác viên, các nội dung đã được kiểm tra, ví dụ: nhật ký nhiệt độ, ngày lấy mẫu và phân tích mẫu. Các kết quả thử nghiệm được nêu trong Bảng I.1.

Bảng I.1 – Dữ liệu thô

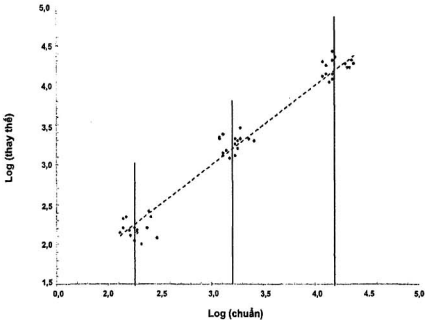
Cộng tác viên	Mức	Phương pháp chuẩn		Phương pháp thay thế	
		Lặp lại 1	Lặp lại 2	Lặp lại 1	Lặp lại 2
1	Thấp	300	260	120	220
2	Thấp	250	210	260	100
3	Thấp	180	160	110	150
4	Thấp	150	140	220	210
5	Thấp	190	164	150	130
6	Thấp	140	190	160	140
7	Thấp	180	240	160	160
8	Thấp	130	150	140	220
1	Trung bình	1800	1900	2 000	2 900
2	Trung bình	1 200	1300	2 100	1300
3	Trung bình	1700	1500	2 100	1200
4	Trung bình	1400	1300	1500	2 400
5	Trung bình	1700	1800	1300	1600
6	Trung bình	1900	1700	2100	1800
7	Trung bình	2 300	2 600	2100	2 000
8	Trung bình	1200	1300	2 200	1400
1	Cao	21000	15 000	17 000	27 000
2	Cao	24 000	16 000	19 000	23 000
3	Cao	15 000	14 000	21000	11000
4	Cao	13 000	13 000	14 000	14 000
5	Cao	15 000	22 000	14 000	17 000
6	Cao	23 000	20 000	21000	19 000
7	Cao	12 000	15 000	13 000	12 000
8	Cao	13 000	12 000	18 000	20 000

Thao tác đầu tiên trước khi tính là chuyển tất cả các kết quả thử nghiệm về \log_{10} . Bảng I.2 chứa các kết quả thử nghiệm đã chuyển đổi sang \log_{10} và các bước tính kế tiếp. Các bước và các ký hiệu tham khảo 6.2.3

Bảng I.2 – Dữ liệu đã chuyển về \log_{10} và tính toán

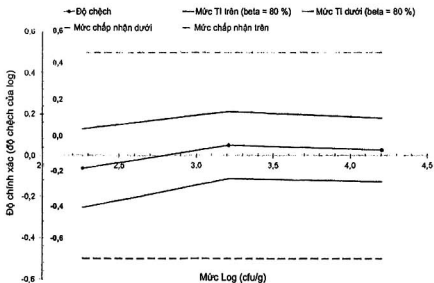
Chuyển về \log_{10}		Thấp				Trung bình				cao			
Cộng tác viên		Chuẩn		Thay thế		Chuẩn		Thay thế		Chuẩn		Thay thế	
	1	2,48	2,41	2,08	2,34	3,26	3,28	3,30	3,46	4,32	4,18	4,23	4,43
	2	2,40	2,32	2,41	2,00	3,08	3,11	3,32	3,11	4,38	4,20	4,28	4,36
	3	2,26	2,20	2,04	2,18	3,23	3,18	3,32	3,08	4,18	4,15	4,32	4,04
	4	2,18	2,15	2,34	2,32	3,15	3,11	3,18	3,38	4,11	4,11	4,15	4,15
	5	2,28	2,21	2,18	2,11	3,23	3,26	3,11	3,20	4,18	4,34	4,15	4,23
	6	2,15	2,28	2,20	2,15	3,28	3,23	3,32	3,26	4,36	4,30	4,32	4,28
	7	2,26	2,38	2,20	2,20	3,36	3,41	3,32	3,30	4,08	4,18	4,11	4,08
	8	2,11	2,18	2,15	2,34	3,08	3,11	3,34	3,15	4,11	4,08	4,26	4,30
Bước 1						3,21				4,20			
Bước 2		P		8		8		8		8		8	
		s_r		058		0,138		0,028		0,118		0,077	
		s_L		094		0,000		0,098		0,000		0,071	
		s_R		111		0,138		0,102		0,118		0,105	
Bước 3		\bar{y}_i						3,26				4,23	
Bước 4								0,050		0,026			
Bước 5		G_i						1,000				0,882	
		H_i		62		0,00		12,11		0,00		0,854	
		v		9,21		14,93		7,56		14,93		11,72	
		T				1,34				1,34			
		STH				0,143				0,121		0,114	
		KM						1,382				1,402	
Bước 6		$U_i - X_i$						0,213				0,181	
		$L_i - X_i$						-0,112				-0,128	

Hình 1.1 cho thấy các điểm dữ liệu sau khi chuyển đổi \log_{10} . Ở giai đoạn này, kiểm tra bằng mắt cho thấy phương pháp thay thế cho kết quả tỉ lệ thuận với phương pháp chuẩn. Ngoài ra, dữ liệu được phân bố gần với đường phân giác đầu tiên có độ dốc tương đương với "một" và khẳng định kết quả này. Trong hình 1.1 cũng có các trung vị của các phép đo thu được với phương pháp chuẩn đối với mỗi mức được hiển thị (các đường thẳng đứng).



Hình 1.1 – Kiểm tra tuyến tính bằng quan sát

Trong bước 6, các giới hạn của β -ETI tính được. Các giá trị này được thu thập trong một biểu đồ cùng với các Giới hạn Chấp nhận (AL). Biểu đồ này được thể hiện trong Hình 1.2. Điều này cho thấy rằng không mức nào và giới hạn chấp nhận nào bị vượt quá. Kết luận rằng phương pháp thay thế được xác nhận giá trị sử dụng đầy đủ so với phương pháp chuẩn từ 185 cfu đến 15 000 cfu với việc chấp nhận 0,5 như đã nêu trong bước 7.



Hình I.2 – Độ chính xác của phương pháp thay thế sử dụng $\beta = 80\%$ và $\lambda = 0,5 \log_{10}$

Lưu ý rằng một số phép tính của Bảng 1.2 đã không được sử dụng vì không cần thực hiện đánh giá bổ sung bước 8 trong 6.2.3. Đây là những phép tính được sử dụng để xác định số bậc tự do và độ lệch chuẩn tái lập của phương pháp chuẩn (V_{rel} và $S_{R,rel}$)

Tuy nhiên, với mục đích minh họa, độ lệch chuẩn tái lập liên phòng thu được là:

$$S_{R,rel} = \sqrt{\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q S_{Ri}^2} = 0,106 \tag{1.1}$$

Giá trị này cần được dùng để tính các giới hạn chấp nhận mới, $ALs = 0,350$ của bước 9.

Tất cả các phép tính có thể dễ dàng thực hiện trong Excel®.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] 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*
- [2] TCVN 8128 (ISO 11133) *Vi sinh vật trong thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và nước – Chuẩn bị, sản xuất, bảo quản và thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy*
- [3] ISO 16297, *Milk – Bacterial count – Protocol for the evaluation of alternative methods*
- [4] TCVN 9331 (ISO/TS 22117) *Vi sinh vật thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn và các yêu cầu cụ thể về thử nghiệm thành thạo thông qua so sánh liên phòng thử nghiệm*
- [5] 79/373/EEC, Council Directive of 2 April 1979 on the marketing of compound feeding stuffs, *Official Journal of the European Communities L 86*, 6-4-1979, p.30
- [6] AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces http://www.eoma.aoc.org/app_j.pdf, 2012
- [7] BLAND J.M., ALTMAN D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986, i pp. 307–310
- [8] GUTMAN I. *Statistical Tolerance Regions: Classical and Bayesian*. Hafner Publishing, Darien, CT, 1970
- [9] HUBERT Ph. *et al.* Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal, Part I: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **36**, 2004, pp. 579-586. Part II: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **45**, 2007, pp. 70–81. Part III: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **45**, 2007, pp. 82–96. Part IV. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 48 pp. 760–771
- [10] JASSON V., UYTENDAELE, M., RAJKOVIC, A., DEBEVERE, J. Establishment of procedures provoking sub-lethal injury of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* O157 to serve method performance testing. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, 118 (3) pp. 241–249
- [11] MCCULLAGH P., NELDER, J.A. *Generalized linear models*. Chapman & Hall, London, Second Edition, 1989

- [12] MEE R.W. β -expectation and β -content tolerance limits for balanced one-way ANOVA random model. *Technometrics*. 1984, 26 (3) pp. 251–253
- [13] ROZET E. *et al.* Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation: application to a diacetyl-monoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic extracts. *Anal. Chim. Acta*. 2007, 591 pp. 239–247
- [14] WEHLING P. *et al.* Probability of Detection (POD) as a Statistical Model for the Validation of Qualitative Methods. *J. AOAC Int.* 2011, 94 pp. 335–337
- [15] WILRICH C., WILRICH, P.T. Estimation of the POD function and the LOD of a qualitative microbiological measurement method. *J. AOAC Int.* 2009, 92 pp. 1763–1772
- [16] MĂRGĂRITESCU I., WILRICH, C. Determination of the Relative Level of Detection of a Qualitative Microbiological Measurement Method with Respect to a Reference Measurement Method. *J. AOAC Int.* 2013, 96 pp. 1086–1091
-