

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9331 : 2012

ISO/TS 22117:2010

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG 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**

Microbiology of food and animal feeding stuffs –

Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison

HÀ NỘI - 2012

Lời nói đầu

TCVN 9331:2012 hoàn toàn tương đương với ISO/TS 22117:2010;

TCVN 9331:2012 do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Các yêu cầu chung về tổ chức các chương trình thử nghiệm thành thạo (PT) trên tất cả các lĩnh vực đã được ISO/CASCO (Ủy ban đánh giá sự phù hợp) đưa ra trong ISO/IEC 17043; ngoài ra, cũng có hướng dẫn chung từ Hiệp hội hóa học cơ bản và ứng dụng quốc tế (IUPAC, xem Tài liệu tham khảo [9]) và Tổ chức hợp tác quốc tế về công nhận phòng thử nghiệm (ILAC, xem Tài liệu tham khảo [8]). Tuy nhiên, những khuyến nghị này có thể không áp dụng trực tiếp được cho tất cả các trường hợp và chúng cần được chuyển tải theo cách riêng cho từng lĩnh vực của phòng thử nghiệm mà chương trình PT được tổ chức. Vì vậy, cần có một tài liệu thiết lập các tiêu chí mà nhà cung cấp chương trình PT (và các đơn vị cộng tác với họ) cần đáp ứng để được nhìn nhận là đủ năng lực để cung cấp các chương trình PT về phân tích vi sinh. Tài liệu này đặc biệt áp dụng đối với các yêu cầu kỹ thuật cụ thể, cần thiết để xử lý các vi sinh vật sống, chẳng hạn như độ đồng nhất và độ ổn định của mẫu, cũng như cách diễn giải của các phép thử phát hiện (có/không có), mà những yêu cầu này chưa được đề cập trong các tài liệu trước.

Chương trình thử nghiệm thành thạo cho phòng thử nghiệm vi sinh chủ yếu được sử dụng để đánh giá kỹ năng phân tích, đặc biệt là độ đúng (độ chệch) và trong một vài trường hợp là độ chụm, của các phép thử vi sinh thực phẩm trong các phòng thử nghiệm cụ thể.

Ngoài ra, dữ liệu từ các chương trình PT này có thể được sử dụng:

- a) để cung cấp thông tin cho các tổ chức có trách nhiệm về chấp nhận phòng thử nghiệm trong một hoạt động kiểm tra chính thức và cho phép kiểm soát liên tục;
- b) để hỗ trợ việc công nhận phòng thử nghiệm trong một hệ thống quản lý chất lượng chung;
- c) để thông báo cho những người có trách nhiệm về chất lượng của các phòng thử nghiệm như là một phần của các yếu tố đào tạo từ đánh giá bên ngoài về độ đúng.

Thông tin từ các chương trình PT cũng có thể được sử dụng để:

- 1) nhận dạng các nguồn sai lỗi có thể, đặc biệt là thành phần độ chệch của độ không đảm bảo đo, để cải thiện kỹ năng phân tích;
- 2) ước lượng độ không đảm bảo đo cho các phương pháp định lượng (xem ISO/IEC 19036⁽⁶⁾) và giới hạn phát hiện của các phương pháp định tính;
- 3) chứng minh năng lực của nhân viên thử nghiệm trong thực hiện một phép thử vi sinh cụ thể;
- 4) đánh giá hoặc thẩm định một phương pháp cụ thể thông qua nghiên cứu độ đúng và độ chụm;
- 5) nhận dạng sự sai khác giữa các phòng thử nghiệm riêng rẽ;
- 6) ấn định một giá trị "đích" cho một đối tượng phân tích trong một vật liệu thử để thiết lập chất chuẩn.

Tuy nhiên, những khía cạnh này không được đề cập cụ thể trong tiêu chuẩn này.

Do đó, các chương trình thử nghiệm thành thạo được tổ chức để đáp ứng một số yêu cầu và chương trình thử nghiệm (tần suất, số lượng mẫu, số lần lặp lại...) cần đáp ứng các yêu cầu của phương pháp được sử dụng và hàng hóa được phân tích và để đạt được mức kiểm soát mà các bên liên quan mong muốn.

Vi sinh vật trong 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

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Specific requirements and guidance
for proficiency testing by interlaboratory comparison*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra các yêu cầu và hướng dẫn đối với việc tổ chức các chương trình thử nghiệm thành thạo về kiểm tra vi sinh vật trong:

- a) thực phẩm và đồ uống;
- b) thức ăn chăn nuôi;
- c) môi trường sản xuất, chế biến và bảo quản thực phẩm;
- d) các công đoạn đầu của dây chuyền sản xuất.

Tiêu chuẩn này cũng có thể áp dụng cho kiểm tra vi sinh trong nước khi nước được sử dụng trong quá trình sản xuất thực phẩm hoặc khi nước được coi là một loại thực phẩm theo quy định pháp luật.

Tiêu chuẩn này có liên quan đến tổ chức kỹ thuật và thực hiện chương trình thử nghiệm thành thạo, cũng như xử lý thống kê các kết quả kiểm tra vi sinh.

Tiêu chuẩn này được thiết kế để sử dụng cùng với TCVN ISO/IEC 17043 và ISO 13528, và chỉ liên quan đến các lĩnh vực trong đó cần có các chi tiết cụ thể hoặc bổ sung đối với các chương trình thử nghiệm thành thạo về phân tích vi sinh như được nêu ở trên.

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 9331:2012

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

TCVN 6910-5 (ISO 5725-5) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 5: Các phương pháp xác định độ chụm của phương pháp đo tiêu chuẩn.*

TCVN 6404 (ISO 7218) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật*

TCVN 8244-1 (ISO 3534-1) *Thống kê học – Từ vựng và ký hiệu – Phần 1: Thuật ngữ chung về thống kê và thuật ngữ dùng trong xác suất*

TCVN 8244-2 (ISO 3534-2) *Thống kê học – Từ vựng và ký hiệu – Phần 2: Thống kê ứng dụng*

TCVN ISO/IEC 17043:2011 *Đánh giá sự phù hợp – Yêu cầu chung đối với thử nghiệm thành thạo*

ISO 13528 *Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons (Các phương pháp thống kê sử dụng trong thử nghiệm thành thạo thông qua so sánh liên phòng thử nghiệm)*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa trong TCVN 8244-1 (ISO 3534-1), TCVN 8244-2 (ISO 3534-2), TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), TCVN 6910-5 (ISO 5725-5), ISO 13528, TCVN ISO/IEC 17043 cùng với các thuật ngữ và định nghĩa sau:

CHÚ THÍCH 1: Một số thuật ngữ được sử dụng trong tiêu chuẩn này có nghĩa khác trong thống kê và vi sinh vật học, ví dụ tính đồng nhất, tính không đồng nhất, phép thử, mẫu, sự phân bố. Nội dung tiêu chuẩn sẽ chỉ rõ có hay không các thuật ngữ chỉ mẫu thử vi sinh hoặc các tập hợp dữ liệu được sử dụng cho phân tích thống kê.

CHÚ THÍCH 2: Một số nhà cung cấp thử nghiệm thành thạo sử dụng thuật ngữ đánh giá chất lượng bên ngoài (EQA) để đề cập đến các chương trình với nghĩa rộng hơn cho tất cả lĩnh vực hoạt động của một phòng thử nghiệm và một vấn đề được đảo tạo cụ thể. Các yêu cầu của tiêu chuẩn này bao trùm các hoạt động EQA đáp ứng định nghĩa về thử nghiệm thành thạo.

3.1

Vi sinh vật đích (target organism)

Vi sinh vật được chỉ định phân tích trong một mẫu thử nghiệm thành thạo.

3.2

Vi sinh vật nền (background flora)

Hệ vi sinh vật có trong một mẫu thử nghiệm thành thạo, có thể được đưa vào để cạnh tranh hoặc gây nhầm lẫn với vi sinh vật đích.

3.3

Chủng đối chứng (reference strain)

Vi sinh vật thu được trực tiếp từ một bộ sưu tập chủng chính thức và được xác định ít nhất đến mức chi và loài, được phân loại và mô tả theo các đặc trưng của chúng và tốt nhất là có nguồn gốc từ thực phẩm hoặc nước, nếu có thể.

[TCVN 8128-1:2009 (ISO/TS 11133-1:2009)^[3], 3.3.2]

3.4

Tỉ lệ thu hồi (recovery percentage)

Tỉ lệ từ giá trị ấn định của vi sinh vật đích được thu hồi bởi đơn vị tham gia.

CHÚ THÍCH 1: Tỉ lệ thu hồi được tính bằng cách nhân số đơn vị hình thành khuẩn lạc (cfu) thu hồi được trên một đơn vị thể tích hoặc khối lượng với 100.

CHÚ THÍCH 2: Tỉ lệ thu hồi có thể thấp đáng kể dưới 100 % khi có mặt các vi sinh vật cạnh tranh và các ảnh hưởng của nền mẫu trong mẫu thử nghiệm thành thạo.

4 Thiết kế và mục tiêu của chương trình

4.1 Yêu cầu chung

Yêu cầu chung về thiết kế các chương trình PT đã được nêu trong TCVN ISO/IEC 17043; trong tiêu chuẩn này chỉ đề cập đến những khía cạnh yêu cầu xem xét đặc biệt đối với các chương trình PT về vi sinh vật trong nội dung của những nguyên tắc chung này.

4.2 Mục tiêu của chương trình

Mục tiêu cơ bản của mọi chương trình PT là cung cấp thông tin cho phép các phòng thử nghiệm tin tưởng vào độ tin cậy của kết quả phân tích của mình.

Các yêu cầu chi tiết về một kế hoạch được lập thành văn bản cho chương trình PT đã được đề cập trong TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.4.1.3 và kế hoạch này cũng cần bao gồm việc tham chiếu các quy định liên quan. Ví dụ về kế hoạch cho chương trình thử nghiệm vi sinh thực phẩm điển hình được nêu trong Phụ lục A.

Các nghiên cứu cần thiết để lập một chương trình PT mới thì rất rộng và phải được xác định rõ trong mục tiêu của chương trình. Những nội dung này tối thiểu cần bao gồm các yêu cầu được nêu trong Điều 5. Các yêu cầu đối với việc kiểm tra các đợt thử nghiệm riêng rẽ, bao gồm thử độ đồng nhất và độ ổn định, cũng cần được thiết lập khi thiết kế chương trình và phải phù hợp với các mục tiêu của chương trình.

4.3 Yêu cầu về phòng thử nghiệm tham gia chương trình

Các yêu cầu chung về trang thiết bị phòng thử nghiệm thích hợp để xử lý tất cả các khía cạnh của chương trình PT được nêu trong TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.3.1 và các yêu cầu an toàn được đề cập trong TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.6.2.4.

Đối với các chương trình về vi sinh vật, nhà cung cấp phải có chính sách được lập thành văn bản nhằm lưu ý các đơn vị tham dự về các mối nguy và đảm bảo rằng đã đưa ra những lời khuyên thích đáng về an toàn (xem Điều 7). Ví dụ: các phòng thử nghiệm vi sinh thực phẩm phải có trang thiết bị thích hợp để xử lý các vi sinh vật ở cấp độ nguy hiểm: 1, 2, 3 [xem TCVN 6404 (ISO 7218), 3.2], nếu cần.

4.4 Lựa chọn các nền mẫu

Những yêu cầu chung về viện dẫn các nền mẫu thử trong kế hoạch chương trình được nêu trong TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.4.1.3 và chọn lựa nền mẫu phản ánh các dạng mẫu thường gặp trong TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.4.2.3.

Những lý do để lựa chọn một nền mẫu cần được công bố, ví dụ: để cung cấp mức độ ổn định và đồng nhất của mẫu phù hợp với mục tiêu đã định của chương trình.

Khi mô tả các nội dung thử nghiệm phải chỉ rõ nền mẫu (tự nhiên hoặc nhân tạo); vi sinh vật nhiễm tự nhiên hay nhân tạo; nguồn chủng và xuất xứ nhằm tuân thủ quy định vận chuyển quốc tế; và bất kỳ phương pháp bảo quản nào được sử dụng, ví dụ: đông khô, thổi khô.

4.5 Thông tin về phương pháp thử được nhà cung cấp PT sử dụng

Các yêu cầu chung đối phương pháp được nhà cung cấp PT sử dụng được nêu trong TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.4.1.3.

Nếu chương trình đặt mục tiêu là một hoặc nhiều phép thử đã được cụ thể hóa hoặc được yêu cầu trong các quy định, các phép thử thông dụng để kiểm soát chất lượng trên mẫu thử nghiệm thành thạo (ví dụ độ đồng nhất và độ ổn định) phải được thực hiện theo các phương pháp chỉ định trong quy định đó và phải công bố điều này (xem TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.5.1).

Các đơn vị tham gia phải được khuyến khích sử dụng phương pháp thông dụng của phòng thử nghiệm nhưng khi họ tiến hành các phép thử theo quy định thì phải đưa ra hướng dẫn ở mức độ nhất định, ví dụ: viện dẫn các phương pháp ISO, các văn bản pháp quy hoặc các ấn bản đã được bình duyệt (TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.5.1).

4.6 Thiết kế thống kê

Các yêu cầu chung cho thiết kế thống kê được nêu trong TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.4.4.

Một bản mô tả thiết kế thống kê cho chương trình PT về vi sinh phải chỉ ra rằng các phân tích thống kê được sử dụng chịu ảnh hưởng từ mức độ đồng nhất của vật liệu thử, mà chính mức độ đồng nhất này cũng bị tác động bởi các biến ngẫu nhiên trong phân bố của các vi sinh vật.

Ngoại trừ số lượng nhỏ, một phân bố chuẩn theo hàm log thường được kỳ vọng trong dữ liệu phân tích định lượng và các phương pháp phân tích thống kê thích hợp phải được ứng dụng cho dữ liệu này [TCVN ISO/IEC 17043:2011, B.3.1.4d)]. Khi số lượng vi sinh vật thấp được yêu cầu trong các phép thử định lượng (ví dụ: trong kiểm tra mẫu nước hoặc đồ uống) thì áp dụng phân bố Poisson thích hợp hơn do độ biến thiên về số lượng vi sinh vật giữa các đơn vị khác nhau của vật liệu thử trở nên khá lớn và có thể che khuất độ biến thiên trong kỹ năng thao tác.

Độ đồng nhất của mẫu thông thường phải ở mức không gây ảnh hưởng đáng kể đến sự sai khác nhận thấy được giữa các phòng thử nghiệm.

Các phép thử bán định lượng và các phép thử phát hiện định tính cần đến các phương pháp thống kê khác nhau để phân tích dữ liệu và các phương pháp này được xem xét kỹ hơn trong 8.3 và 8.4.

Kế hoạch chương trình PT cần phân biệt rõ giữa các thử nghiệm thành thạo đối với phương pháp phát hiện và các thử nghiệm thành thạo đối với định lượng các vi sinh vật đích.

5 Yêu cầu kỹ thuật và hướng dẫn thiết kế mẫu và thành phần mẫu

5.1 Mật độ vi sinh vật đích

Vi sinh vật đích phải được cung cấp ở các mức phù hợp để cho thấy rằng các phương pháp kiểm tra thích hợp với mục đích sử dụng và để phản ánh mức nhiễm thường tìm thấy trong các dạng nền mẫu được thử (TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.4.2.3). Khi các vi sinh vật gây bệnh là vi sinh vật đích thì các mức nhiễm cũng cần tính đến và phản ánh mức độ có thể gây nguy hiểm cho sức khỏe của người, cũng như mọi giới hạn được quy định trong tiêu chuẩn vi sinh, nếu cần.

CHÚ THÍCH: Mức nhiễm gây hại cho sức khỏe con người không phải luôn luôn được biết chính xác và phụ thuộc vào độ miễn cảm của từng cá nhân. Mục đích của việc kiểm tra vi sinh gây bệnh là để ngăn ngừa bệnh tật và cũng để phát hiện các yếu tố gây bệnh ở mức rất thấp trước khi chúng có thể tăng trưởng lên mức cao hơn.

Đối với các phương pháp định lượng thì mật độ vi sinh vật đích phải phù hợp với nồng độ thường được tìm thấy và các quy định của nhà nước áp dụng cho nền mẫu được sử dụng. Mật độ vi sinh vật đích đôi khi cũng nên gần với mức giới hạn định lượng của các phương pháp thông dụng để thử thách kỹ năng của các đơn vị tham gia so với phạm vi đo của phương pháp. Tuy nhiên, không nên gửi đi những mẫu có mật độ vi sinh ở mức quá thấp đến nỗi khi sử dụng các độ pha loãng thông thường thì giá trị trung bình dự kiến của số lượng vi sinh trong một mẫu ít hơn 10 khuẩn lạc trên một đĩa cấy.

Đối với các phương pháp định tính (phát hiện), các vi sinh vật đích nhìn chung được yêu cầu ở một mức thấp vừa đủ cho một thử thách có căn cứ về phương pháp luận và đóng góp dữ liệu cho hoạt động thẩm định nhằm thiết lập hoặc thẩm tra các giới hạn phát hiện của từng phòng thử nghiệm tham gia.

5.2 Nguồn gốc, đặc tính và khả năng truy xuất của các chủng vi sinh vật

Các đặc tính của vi sinh vật đích phải được thiết lập trước khi sử dụng để đánh giá kỹ năng một cách đáng tin cậy, đặc biệt trong các chương trình cho phép các đơn vị tham gia sử dụng các phương pháp luận khác nhau.

Cả chủng điển hình và không điển hình đều cần xem xét và đưa vào chương trình để thử thách kỹ năng phân tích của phòng thử nghiệm.

Những chủng đối chứng được các bảo tàng chủng quốc tế công nhận nên được sử dụng trong trường hợp chúng là phù hợp nhất cho mục đích của chương trình; tuy nhiên, các chủng do phòng thử nghiệm phân lập hoặc các chủng "hoang dại" được phân lập từ các nền mẫu sử dụng trong các chương trình PT cũng hữu ích để làm cho mẫu gần với thực trạng hơn. Khi các chủng này được sử dụng, chúng cần được mô tả đủ đặc điểm theo các phương pháp chuẩn thích hợp để đảm bảo rằng bất kỳ phản ứng không điển hình nào đều được đơn vị tổ chức PT nhận biết trước khi sử dụng.

Trong tất cả các trường hợp, các vi sinh vật được sử dụng trong các mẫu của chương trình PT cần có khả năng truy xuất đến bảo tàng chủng tương ứng hoặc được nhà tổ chức chương trình xác nhận dữ liệu mô tả đặc điểm.

Trong một vài trường hợp, không thể sử dụng các chủng đối chứng hoặc các mẫu chuẩn từ nguồn chuẩn quốc tế đã biết hoặc các chủng do phòng thử nghiệm nuôi cấy, ví dụ chương trình PT đối với các vi sinh vật không thể nuôi cấy như các norovirus ở người. Trong những trường hợp này, vật phẩm y tế có thể được dùng để gây nhiễm nhân tạo lên một nền mẫu kiểm tra, bằng cách nhúng, phun, hoặc thông qua sự tích lũy sinh học ở nhuyển thể hai mảnh vỏ. Phương pháp gây nhiễm nhân tạo phải càng gần với con đường lây nhiễm tự nhiên càng tốt. Cần hết sức thận trọng khi thao tác với mẫu bệnh phẩm ở người, phân hoặc các mẫu dịch nôn và các mẫu này phải được sàng lọc tác nhân gây bệnh phụ trước khi sử dụng. Các vi rút đích cần được mô tả đầy đủ ở mức độ dòng bằng kỹ thuật PCR cổ điển kèm theo giải trình tự gen.

5.3 Hệ vi sinh vật nền và cạnh tranh

Tổng hệ vi sinh vật của mẫu thử, do nhiễm tự nhiên hoặc nhân tạo, phải được lựa chọn để đánh giá năng lực của các đơn vị tham gia trong việc phát hiện và/hoặc định lượng vi sinh vật đích trong sự hiện diện của hệ vi sinh vật nền không phải đích (điển hình cho loại mẫu thử) và các vi sinh vật giả đích, mà nếu thiếu các phép thử khẳng định thích hợp có thể dẫn đến các kết quả dương tính giả.

Bất kỳ chủng nào được sử dụng để tạo hệ vi sinh nền cũng phải đáp ứng các yêu cầu của 5.2 về các đặc tính và khả năng truy xuất. Trong những mẫu nhiễm tự nhiên, phải xác định những ảnh hưởng của hệ vi sinh nền mẫu lên vi sinh vật đích.

5.4 Lựa chọn nền mẫu và các ảnh hưởng

Tất cả nền mẫu phải được đánh giá trước khi sử dụng để kiểm tra các tác động đến vi sinh vật đích và hệ vi sinh nền, ví dụ nền mẫu làm giảm độ thu hồi các vi sinh đích được đưa vào gây nhiễm.

Các đơn vị tham gia phải được cảnh báo về bản chất của nền mẫu thực phẩm khi biết những nền mẫu này có ảnh hưởng bất lợi đến độ thu hồi các vi sinh vật (ví dụ: các nền mẫu bắt và giữ lại các tế bào, chẳng hạn như chất béo) hoặc có chất diệt khuẩn hay có chất tính chất kim hãm vi khuẩn. Thông tin gửi đến các đơn vị tham gia phải bao gồm các quy trình chuẩn bị thích hợp và được thẩm định.

Những nền mẫu được sử dụng cho các chương trình PT về vi sinh thông thường (nhưng không cần thiết) được tiệt trùng trước khi dùng. Khi gửi các mẫu tự nhiên không tiệt trùng, nhà tổ chức phải xác định ảnh hưởng của hệ vi sinh nền trong mẫu.

6 Xác nhận giá trị của mẫu bởi nhà cung cấp

6.1 Yêu cầu chung

Những yêu cầu chung về kiểm tra, xác nhận giá trị mẫu được nêu trong TCVN ISO/IEC 17043 và ISO 13528 (xem thêm Tài liệu tham khảo [9]); phần này mở rộng các yêu cầu cụ thể và những trở ngại đối với việc thử độ ổn định và độ đồng nhất của vật liệu thử có chứa vi sinh vật sống.

6.2 Thử độ đồng nhất – Xem xét tổng quan

(Xem thêm TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.4.3 và B.5.)

Các phép thử độ thành thạo có thể liên quan đến việc chuẩn bị một khối lớn vật liệu thử, sau đó chia thành các phần nhỏ gần như nhau để gửi đến các đơn vị tham gia. Cách khác, các phần mẫu nhỏ này có thể được nuôi cấy riêng biệt và gửi đi.

Dù sử dụng phương pháp chuẩn bị nào thì vật liệu thử cũng phải được đánh giá về độ đồng nhất, thường là trước cũng như vào cùng thời điểm thử đối với các loại vật liệu tươi, không bền vững.

Phép thử độ đồng nhất cần được thực hiện đối với mỗi mẻ mẫu, dựa trên các nguyên tắc thống kê thích hợp (TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.4.3.2 và B.5). Các phép thử như vậy được nêu trong ISO 13528 hoặc trong Phụ lục B.

Cũng cần kiểm tra độ đồng nhất nếu các vật liệu được lưu trong khoảng thời gian dài để đảm bảo vẫn đáp ứng các chuẩn mực đã định trước khi sử dụng. Số mẫu được kiểm tra từ mỗi mẻ chuẩn bị cần

TCVN 9331:2012

phải đủ để thu được các thông tin thực tế về độ đồng nhất của mẻ mẫu đó; số lượng đề xuất là 10 mẫu (được thử kép, nếu cần).

Một vật liệu thử kém đồng nhất vẫn có thể được sử dụng cho một đợt thử nghiệm thành thạo (TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.4.3.1, Chú thích 3), miễn là các nguyên tắc thống kê thích hợp được áp dụng để tính đến phương sai lớn hơn giữa các mẫu (xem ISO 13528). Một phương án thống kê đối với các vật liệu không đồng nhất bao gồm cả phép phân tích lặp lại một vài mẫu thử [xem TCVN 6910-5 (ISO 5725-5)] nên được sử dụng để giảm thiểu ảnh hưởng từ mẫu thiếu đồng nhất khi đánh giá kỹ năng phân tích của các đơn vị tham gia.

6.3 Thử độ đồng nhất đối với các mẫu định lượng

Các yêu cầu chung và quy trình kiểm tra độ đồng nhất của mẫu thử thành thạo định lượng được nêu trong TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.4.3, B.5 và ISO 13528.

Các vật liệu cho thấy sự khác nhau giữa các đơn vị mẫu đủ lớn để gây ảnh hưởng đáng kể lên việc đánh giá kỹ năng phân tích của phòng thử nghiệm thì không nên sử dụng trong các nghiên cứu liên phòng thử nghiệm trừ khi có các yêu cầu và các phương pháp phân tích dữ liệu đặc biệt áp dụng, ví dụ số lượng thấp vi sinh vật trong nước uống và các dạng mẫu khác.

Chuẩn mực về “đủ đồng nhất” được xác định bởi các yêu cầu so sánh liên phòng (xem ISO 13528 và Phụ lục B). Tuy nhiên, nhìn chung một vật liệu mà có độ lệch chuẩn giữa các đơn vị mẫu (trên thang chuyển thích hợp) $\leq 0,3 \sigma_p$, trong đó σ_p là độ lệch chuẩn đích được sử dụng để đánh giá kỹ năng phân tích của các phòng thử nghiệm, thì được coi là đủ đồng nhất (xem ISO 13528).

Mọi phép thử khác về độ đồng nhất cần đáp ứng những tiêu chí dưới đây (theo Tài liệu tham khảo [9]):

- a) xác suất loại bỏ một vật liệu thử đủ đồng nhất phải $\leq 5 \%$;
- b) vật liệu thử có độ biến thiên giữa các đơn vị mẫu là $1,5 \sigma_p$ có xác suất bị loại bỏ lớn hơn hoặc bằng 80% , trong đó σ_p là mức sai lệch chấp nhận được giữa các phòng thử nghiệm (được biểu thị theo độ lệch chuẩn mục tiêu).

Xác suất 80% loại bỏ một vật liệu thử khi độ biến thiên giữa các đơn vị mẫu là $1,5 \sigma_p$ được dựa trên các nghiên cứu mô phỏng phân tích kép 10 đơn vị mẫu thử sử dụng một phương pháp có độ lệch chuẩn phân tích là $0,5 \sigma_p$ (nghĩa là $0,125$ đơn vị log) và một giá trị tới hạn đối với T_2 (xem Phụ lục B) đáp ứng tiêu chí a) nêu trên. Điều này thể hiện kết quả đạt được với nỗ lực phân tích hợp lý.

Các phép thử độ đồng nhất dựa trên cơ sở ước lượng phương sai giữa các đơn vị mẫu và phương sai do phân tích (độ lặp lại) thu được trong các điều kiện lặp lại. Các phương pháp thử thích hợp đối với độ biến thiên như trên được nêu trong Phụ lục B.

Phương sai trong phân tích (độ lặp lại) cần được ước tính từ các phân tích kép huyền phù gốc nhận được từ các phần mẫu thử (Tài liệu tham khảo [15][16]). Phương sai phân tích này cũng có thể được tính từ số lượng khuẩn lạc được đếm và độ chụm của vật liệu thử được sử dụng (Tài liệu tham khảo [10]).

Trong vi sinh học, phương sai giữa các đơn vị mẫu phải được ước tính trong điều kiện lặp lại (trong một lần phân tích). Nếu điều này không thể tiến hành thì phương sai giữa các đơn vị mẫu bao gồm cả độ tái lập nội bộ phòng thử nghiệm và có thể dẫn đến việc loại bỏ sai một vật liệu phù hợp.

Khi số lượng khuẩn lạc đếm được đủ lớn (nhiều hơn 35 đến 40 khuẩn lạc trong mỗi đĩa) thì độ lệch chuẩn phân tích, σ_{an} , thường thỏa mãn:

$$\frac{\sigma_{an}}{\sigma_p} < 0,5$$

trong đó σ_p là độ lệch chuẩn đích, và nên sử dụng phép thử độ "đồng nhất đủ" được nêu trong Tài liệu tham khảo [11] (xem Phụ lục B). Nếu số khuẩn lạc thấp (nhỏ hơn 35 đến 40 khuẩn lạc trên mỗi đĩa) thì nên dùng phép thử T_1 - T_2 (xem Phụ lục B).

Khi các đơn vị mẫu thử kép được cung cấp cho các phòng thử nghiệm tham gia chương trình thì khả năng biến thiên giữa các đơn vị mẫu nhận được bởi các phòng thử nghiệm cần được nhà cung cấp kiểm tra để đánh giá độ đồng nhất của vật liệu thử. Cho dù khả năng biến thiên bao gồm cả độ tái lập nội bộ phòng thử nghiệm thì khi số lượng phòng thử nghiệm tham gia càng lớn sẽ làm tăng nguồn thống kê của phép phân tích này và có thể là một chỉ thị tốt cho các vòng thử nghiệm thành thạo kế tiếp.

Khi số khuẩn lạc đếm được thấp (nhỏ hơn 20), phương sai (độ lặp lại) phân tích sẽ cao. Trong trường hợp này, nhà cung cấp nên khuyến nghị các phòng thử nghiệm tham gia chương trình lặp lại phép đếm trên các phần mẫu thử để thỏa mãn điều kiện (xem ISO 13528):

$$\frac{\sigma_r}{\sqrt{n}} \leq 0,3\sigma_p$$

trong đó:

σ_r là độ lệch chuẩn lặp lại;

σ_p là độ lệch chuẩn đích;

n là số phép thử lặp.

Nếu điều kiện trên không thỏa mãn thì kĩ năng phân tích của phòng thử nghiệm cần được đánh giá thận trọng.

Khi mẫu PT chứa số lượng khuẩn lạc thấp (nhỏ hơn 20) thì phải xác định sự sai khác giữa các đơn vị mẫu (nghĩa là giữa các mẫu lặp lại) để chứng minh rằng nó không vượt quá biến ngẫu nhiên (Poisson) nhằm đưa ra một sự đánh giá có ý nghĩa. Chỉ số phép thử độ phân bố trên n mẫu (trong đó n tối thiểu là 10) không nên vượt quá giá trị χ^2_{n-1} với mức xác suất 0,05.

6.4 Thử độ đồng nhất mẫu đối với các phương pháp định tính

Các nguyên tắc tương tự được áp dụng để kiểm tra độ đồng nhất mẫu dành cho phương pháp định tính (có mặt/không có), nhưng yêu cầu có các xem xét cụ thể khi mức gây nhiễm vào mẫu thấp (xem 8.4).

Độ đồng nhất của các mẫu định tính có thể được kiểm tra bằng cách đếm trên mẫu thêm chủng. Cũng có thể xác định mức nhiễm bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN). Nếu phương pháp đếm có thể thực hiện thì phép thử độ đồng nhất nêu chi tiết trong 6.3 có thể được sử dụng, tùy thuộc vào cách mẫu được gây nhiễm nhân tạo và cách mà mẫu thêm chủng vi sinh được định lượng.

6.5 Thử độ ổn định của mẫu bởi nhà cung cấp

6.5.1 Yêu cầu chung

Các mẫu dùng cho thử nghiệm liên phòng phải bền vững, ít nhất là trong suốt giai đoạn từ khi chuẩn bị (bởi nhà cung cấp) cho đến ngày phân tích hoặc đến cuối khoảng thời gian cho phép lưu giữ (xem TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.4.3).

Nếu cùng dạng mẫu với cùng loại chủng thử luôn luôn được sử dụng thì chỉ cần tiến hành một phép thẩm định (ví dụ: kiểm tra sau khi chuẩn bị mẫu và vào ngày phân tích) trên các mẫu tiếp theo là đủ. Nhà cung cấp cũng cần kiểm tra các kết quả thu được từ các phòng thử nghiệm tham gia để kiểm tra lại độ ổn định của vật liệu thử trong suốt thời gian cho phép nghiên cứu.

6.5.2 Độ ổn định trong điều kiện bảo quản

Đối với các mẫu ổn định luôn luôn được lưu ở nhiệt độ thấp (ví dụ: $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$) thì độ ổn định phải được xác định bằng cách kiểm tra định kì mật độ vi sinh vật và độ đồng nhất của mỗi mẻ sau các khoảng thời gian định kì trong quá trình lưu mẫu. Khoảng thời gian tối thiểu để thử độ ổn định nên là thời gian giữa giai đoạn chuẩn bị mẫu và một ngày hoặc thời điểm phân tích cụ thể.

Tần suất kiểm tra tùy thuộc vào thông tin sẵn có về mẻ mẫu và tổng thời gian cần thiết để có thông tin về độ ổn định. Ví dụ: nếu tổng thời gian lưu chỉ trong hai tuần thì có thể cần phải kiểm tra hai ngày một lần, nhưng nếu yêu cầu bảo quản trong một năm thì có thể kiểm tra hàng tháng là đủ. Đối với các mẻ mẫu lớn thì tối thiểu 3 mẫu được thử trong mỗi lần để cho thấy độ ổn định thực tế của toàn mẻ (ISO 13528:2005, Phụ lục B). Dù áp dụng tần suất kiểm tra nào thì tần suất đó cũng phải được đơn vị tổ chức chương trình chứng minh và thẩm định là chấp nhận được.

6.5.3 Độ ổn định trong điều kiện vận chuyển

Ngoài những thông tin về độ ổn định trong các điều kiện bảo quản thu thập được trong nghiên cứu thăm định để lập chương trình PT mới, điều quan trọng không kém là kiểm tra ảnh hưởng của “các điều kiện bất thường” lên mẫu, ví dụ thời gian vận chuyển dài trong nhiệt độ cao (xem TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.6.3.2).

Phép thử độ ổn định ở các nhiệt độ khác nhau để phản ánh các điều kiện vận chuyển “tồi tệ nhất” và sự chậm trễ tối đa dự kiến cần được thực hiện ngay từ giai đoạn đầu để kiểm tra tác động của điều kiện xấu lên mẫu thử. Ví dụ: các mẫu trong một mẻ được bảo quản ở nhiệt độ quy định (ví dụ là $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) nhưng cũng được bảo quản ở $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+15\text{ }^{\circ}\text{C}$, và $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mỗi ngày có 5 mẫu được giữ ở mỗi nhiệt độ được phân tích trong tổng thời gian một hoặc hai tuần.

Thiết kế các thực nghiệm về độ ổn định có thể thay đổi nhưng cần thích hợp để nhận được thông tin về ảnh hưởng của các nhiệt độ bảo quản khác nhau lên mẫu thử và thiết lập được giới hạn trên của nhiệt độ khi phòng thử nghiệm tiếp nhận mẫu. Thông tin thu được có thể được sử dụng để lựa chọn điều kiện phân phối tối ưu cho các mẫu của chương trình PT, ví dụ: có cần làm mát mẫu trong suốt quá trình vận chuyển bằng cách sử dụng đá khô hoặc túi nước đá hay vận chuyển trong điều kiện bình thường là có thể chấp nhận được.

Khi phân phối các mẫu miễn cảm với nhiệt độ, yêu cầu phải có hệ thống làm lạnh kiểm soát được với chuẩn mực chấp nhận mẫu nghiêm ngặt như chương trình hỗ trợ thử nghiệm mang tính pháp lý đối với *E. coli* trong nhuyễn thể hai mảnh vỏ, nên đưa các bộ cảm biến nhiệt vào mỗi hộp mẫu để ghi lại nhiệt độ của mẫu trong quá trình vận chuyển. Việc kiểm tra dữ liệu nhiệt độ có thể cho phép các nhà cung cấp chương trình PT giải thích các kết quả bất thường của các đơn vị tham gia.

7 Quản lý mẫu

7.1 Yêu cầu chung

Các yêu cầu về quản lý mẫu thử được nêu trong TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.6.1 và 4.6.2, và chỉ những thông tin bổ sung liên quan đến các mẫu thử vi sinh được nêu trong phần này.

7.2 Hướng dẫn cho các đơn vị tham gia

Đối với mỗi đợt nghiên cứu, từng phòng thử nghiệm tham gia phải nhận được một bộ hướng dẫn rõ ràng bao gồm:

- a) các điều kiện bảo quản cho tất cả các dạng mẫu, đặc biệt thông tin về nhiệt độ bảo quản cần được ghi rõ bên ngoài bao bì vận chuyển mẫu;
- b) nhiệt độ tối đa của mẫu khi tiếp nhận tại phòng thử nghiệm, nếu cần;

TCVN 9331:2012

- c) hướng dẫn cách xử lý mẫu – hoàn nguyên, pha loãng hoặc yêu cầu các xử lý khác, điều này cần được mô tả rõ ràng đối với từng bộ mẫu và từng dạng mẫu thử;
- d) bảng dữ liệu an toàn thích hợp cần đưa vào trong mỗi đơn vị mẫu gửi đi (ví dụ cụ thể được nêu trong Phụ lục D);
- e) những hướng dẫn bổ sung khác như:
 - 1) thời hạn muộn nhất phải tiến hành phân tích và thời hạn gửi kết quả cho nhà tổ chức;
 - 2) phương pháp phân tích (mô tả hoặc lựa chọn của đơn vị tham gia, nếu có yêu cầu);
 - 3) cách thức báo cáo kết quả cho nhà tổ chức, đặc biệt là đơn vị đo;
 - 4) nhà tổ chức có thể yêu cầu chi tiết về vật liệu, phương pháp, điều kiện nuôi cấy..., trong biểu mẫu báo cáo, nếu có, cần đưa ra các hướng dẫn để điền vào biểu mẫu này.

8 Đánh giá kỹ năng thao tác

8.1 Yêu cầu chung

Bất cứ khi nào có thể, các nguyên tắc thống kê được sử dụng để đánh giá năng lực trong chương trình PT nên dựa vào nội dung được nêu trong các tiêu chuẩn như TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.7 và ISO 13528 (xem thêm thông tin tại Tài liệu tham khảo [9]) cho dù các chương trình PT về vi sinh có thể chấp nhận các quy trình khác với quy trình thường được sử dụng trong các lĩnh vực khác nếu những quy trình này thích hợp với chương trình vi sinh cụ thể.

8.2 Xem xét sơ bộ

Thử nghiệm thành thạo liên quan đến sự phân phối định kỳ các vật liệu thử đến các phòng thử nghiệm tham gia để họ kiểm tra mẫu thử về các thông số cụ thể (trong hầu hết các trường hợp là các vi sinh vật). Kết quả kiểm tra sau đó được so sánh với kết quả của các phòng thử nghiệm khác. Do vậy, thử nghiệm thành thạo cung cấp một phương thức thử độc lập và so sánh kỹ năng của từng phòng thử nghiệm.

Việc liên tục đạt kết quả tốt qua các vòng thử nghiệm thành thạo cho thấy phòng thử nghiệm đảm bảo về phương pháp phân tích, đào tạo, trang thiết bị, thuốc thử, quy trình kiểm soát chất lượng, diễn giải kết quả và kỹ thuật báo cáo.

Tuy nhiên, những kết quả không tốt cho thấy kỹ năng phân tích của phòng thử nghiệm yếu khi so với giá trị ấn định và điều này có thể dẫn đến một số những câu hỏi như: tất cả các mẫu thử có giống nhau không; các phòng thử nghiệm khác tiến hành như thế nào, phương pháp có thể có kết quả chệch không và các kết quả đó có được diễn giải đúng không. Do đó, nhà tổ chức chương trình nên sử dụng hệ thống đánh giá kỹ năng phân tích thích hợp để giúp các bên tham gia trả lời những câu hỏi đó.

Có nhiều cách khác nhau để diễn giải dữ liệu từ chương trình thử nghiệm thành thạo nhưng các phương pháp này phải khách quan.

Phần lớn các đơn vị tham gia chương trình PT về vi sinh không quen với phép thống kê và phải tin rằng các quy trình được sử dụng bởi nhà cung cấp chương trình PT là đúng.

Những xem xét dưới đây về nguyên tắc thống kê áp dụng phải được đề cập:

- a) giá trị pháp lý;
- b) thông tin giải thích cho các đơn vị tham gia;
- c) những lý do lựa chọn;
- d) tính chắc chắn.

Các đơn vị tham gia phải được cung cấp các thông tin rõ ràng và không thiên lệch nhằm cho phép họ tự đánh giá và diễn giải kết quả và để tận dụng tối đa các lợi ích từ việc tham gia chương trình.

8.3 Phương pháp định lượng

8.3.1 Yêu cầu chung

Thiết kế thống kê cho chương trình PT đối với các phương pháp định lượng vi sinh vật bị tác động bởi mức độ đồng nhất của vật liệu thử, do đó chịu tác động bởi độ biến thiên ngẫu nhiên về phân bố vi sinh vật trong mẫu. Ngoài ra, dường như có sự khác biệt đáng kể giữa các phòng thử nghiệm tham gia về độ chụm được yêu cầu hoặc mong đợi của một phép thử.

Việc lựa chọn phương pháp thống kê phải tính đến các yếu tố được liệt kê trong 8.1 và 8.2, cùng với các xem xét khác như số lượng các phòng thử nghiệm tham gia trong một chương trình cụ thể. Những tham số đưa đến quyết định các phép thống kê nào được dùng cho phân tích kết quả cần được công bố. Ví dụ: những chương trình đặc biệt có ít hơn 30 đơn vị tham dự; kết quả từ 30 đơn vị tham dự có thể được phân tích theo phương thức khác với các chương trình lớn hơn, ví dụ có 100 đơn vị tham dự.

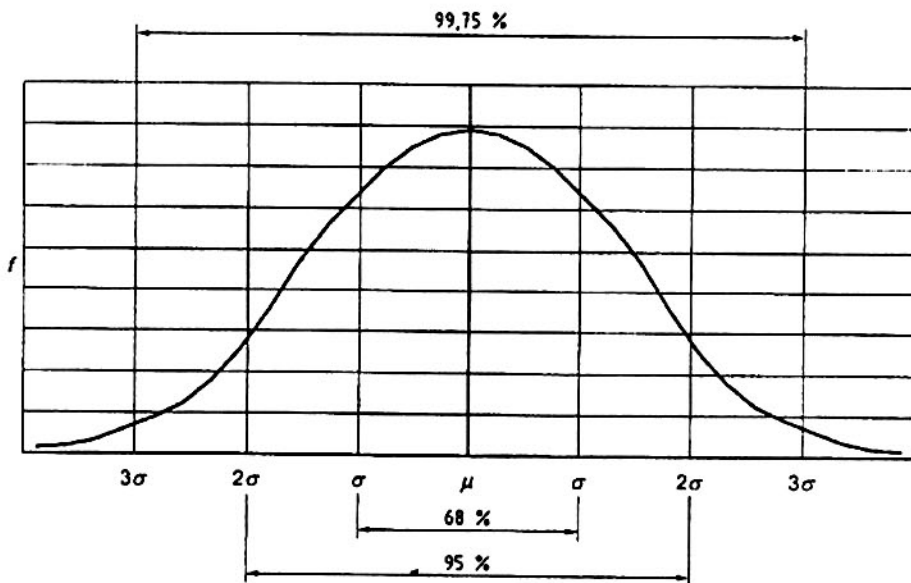
Phương pháp được chọn phân tích thống kê phải thích hợp không chỉ với số lượng phòng thử nghiệm tham gia một phép thử mà còn phải thích hợp với phương pháp thử được sử dụng. Ví dụ: cách phân tích kết quả từ phương pháp đếm khuẩn lạc khác so với phân tích kết quả từ phương pháp MPN. Điều này là do độ biến thiên gắn với phương pháp MPN có xu hướng lớn hơn so với phương pháp đếm khuẩn lạc. Thực tế, các tham số thống kê khác nhau có thể cần đến để đánh giá kĩ năng phân tích của phòng thử nghiệm tham gia đối với các phép thử khác nhau trong cùng một chương trình thử nghiệm (xem TCVN ISO/IEC 17043:2011, 4.5.2). Điều này phải được công bố trong tài liệu thiết kế chương trình thử nghiệm thành thạo và những tiêu chí vi sinh được chấp nhận nói chung nên được viện dẫn trong kế hoạch chương trình PT.

Những phân tích thống kê thích hợp và xác định điểm của phòng thử nghiệm tham gia được đề cập trong TCVN ISO/IEC 17043:2011, Phụ lục B.

8.3.2 Sự phân bố của dữ liệu

Khi một phép thử định lượng được lặp lại vài lần trong các điều kiện lặp lại thì phân bố tần suất của các kết quả sẽ được kỳ vọng tạo thành một đường cong hình chuông, được gọi là phân bố chuẩn.

Các số đếm vi sinh vật thường theo một phân bố chuẩn hàm log và dữ liệu (cần) được chuyển sang các giá trị dạng logarit cơ số 10 để tạo nên một đường phân bố chuẩn. Tuy nhiên, đối với các số lượng nhỏ vi sinh vật, có thể sử dụng các số đếm thực hoặc có thể áp dụng cách chuyển sang dạng căn bậc hai.



CHÚ DẪN:

- f tần số
- μ giá trị trung bình
- σ độ lệch chuẩn

Hình 1 – Đồ thị phân bố chuẩn

Cho dù tiến hành thử trên cùng một mẫu, không phải mọi kết quả đều giống nhau do có một số sai khác nhỏ, độc lập dự kiến sẽ xảy ra trong các thao tác khác nhau liên quan đến quá trình thực hiện phép thử.

Trong thử nghiệm thành thạo, thông thường các phép thử không được thực hiện trong các điều kiện lặp lại, hoặc thậm chí trong các điều kiện tái lập. Các phép thử được tiến hành bởi những người phân tích khác nhau, tại các phòng thử nghiệm khác nhau và vào những thời điểm khác nhau, dùng các thiết

bị, môi trường, thuốc thử và phương pháp phân tích khác nhau và các kết quả này khác nhau nhiều hơn, có thể mô tả như là các điều kiện "siêu tái lập" hoặc "quá tái lập", vì thông thường khái niệm độ tái lập chỉ được sử dụng trong phạm vi một phương pháp đơn lẻ.

Phân bố chuẩn (log) của các kết quả thường quan sát được mặc dù có những khác biệt trong các điều kiện thử nghiệm như trên, và cần sử dụng các nguyên tắc thống kê thích hợp đối với phân bố chuẩn (log) để phân tích dữ liệu, miễn là phân bố này nhìn chung đối xứng và đồng dạng.

Nếu phân bố của dữ liệu không ở dạng chuẩn (log) thì cần xem xét các nguyên nhân có thể và diễn giải dữ liệu sao cho phù hợp với việc sử dụng các phép thử thích hợp khác.

8.3.3 Xác định giá trị ấn định

Mục tiêu của thử nghiệm thành thạo là đánh giá mức độ thành thạo của các bên tham gia trong quá trình đạt đến kết quả "đúng". Tuy nhiên, trong nhiều chương trình thử nghiệm thành thạo, không thể biết được kết quả "đúng" vì nhiều người phân tích có thể kiểm tra trên cùng một vật liệu thử và sẽ đưa ra các kết quả khác nhau ít nhiều.

Thay vào đó, cần ước tính một kết quả "đúng" hay "thực" và điều này viện dẫn đến "giá trị ấn định". Giá trị ấn định này có thể xác định được bằng một số phương pháp được nêu trong TCVN ISO/IEC 17043:2011, B.2 và ISO 13528.

Phương pháp phổ biến nhất trong các chương trình thử nghiệm thành thạo vì sinh là đồng thuận giá trị từ các phòng thử nghiệm tham gia. Giá trị ấn định được xác định từ giá trị trung bình thô hoặc trung vị của các kết quả từ tất cả các bên tham gia. Việc sử dụng các phương pháp thô nhằm giảm thiểu ảnh hưởng của các giá trị bất thường, để không cần loại các kết quả đó khỏi dữ liệu vì có thể khó nhận dạng các giá trị bất thường "thực sự".

Giá trị ấn định có độ không đảm bảo cao hơn so với các phương pháp khác, nhưng điều này được tính đến khi đánh giá kĩ năng của phòng thử nghiệm. Giá trị ấn định được cho là hợp lý vì kết quả của tất cả các bên tham gia đều đóng góp vào việc tính toán.

Nếu một trung vị tổng thể thấp được tạo thành, trong khi giá trị ấn định được thiết lập từ giá trị đồng thuận (ví dụ: do có nhiều đơn vị tham gia khó phân lập hoặc khó nhận dạng một vi sinh vật cụ thể nào đó), các nhà tổ chức chương trình cần đưa ra nhận xét hợp lý để kỹ năng của các phòng thử nghiệm không có kết quả giả được đánh giá chính xác.

8.3.4 Độ không đảm bảo đo của giá trị ấn định

Giá trị ấn định thể hiện giá trị ước tính tốt nhất của giá trị "thực". Có một độ không đảm bảo đo chuẩn biểu thị mức tin cậy trong giá trị ước tính này. Nếu độ không đảm bảo đo chuẩn của giá trị ấn định quá lớn so với độ lệch chuẩn của đợt thử thành thạo thì sau đó một vài phòng thử nghiệm tham gia sẽ

TCVN 9331:2012

nhận được các đánh giá cảnh báo và hành động, không phải vì kỹ năng phân tích của họ mà do độ không đảm bảo đo lớn trong giá trị ấn định.

Vì vậy, cần thiết lập các tiêu chí chấp nhận một giá trị ấn định theo độ không đảm bảo đo của nó. Một vài phương pháp để ước tính độ không đảm bảo đo này và xác định khả năng chấp nhận đã có sẵn và được mô tả trong ISO 13528.

8.3.5 Các phương pháp đánh giá kỹ năng

Nhà tổ chức chương trình PT phải xác định giá trị ấn định và đánh giá kết quả từ mỗi phòng thử nghiệm lệch bao nhiêu khi so giá trị ấn định với kết quả từ tất cả các phòng thử nghiệm tham gia khác. Như vậy, kỹ năng phân tích của từng đơn vị tham gia được xem xét không dựa trên kết quả "đúng" mà dựa trên ước tính thống kê của kết quả "đúng" từ tất cả số liệu báo cáo thu được. Lượng dữ liệu càng lớn thì các ước tính thống kê dường như càng chính xác hơn.

Các phương pháp chung về đánh giá kỹ năng và tính điểm được nêu chi tiết trong TCVN ISO/IEC 17043:2011, B.3 và ISO 13528.

8.3.6 Sử dụng chỉ số z

8.3.6.1 Yêu cầu chung

Một phương pháp thông dụng và được chấp nhận rộng rãi trong thử nghiệm thành thạo là hệ thống chỉ số z (z-score), do hệ thống này tương đối dễ tính toán và diễn giải (xem TCVN ISO/IEC 17043:2011, B.3). Chỉ số z cho biết chênh lệch giữa một giá trị nào đó so với giá trị trung bình bằng bao nhiêu lần độ lệch chuẩn, ví dụ chỉ số z bằng 2 thể hiện chênh lệch giữa một giá trị so với giá trị trung bình là 2σ , trong đó σ là độ lệch chuẩn.

Như được mô tả trong Hình 1, dữ liệu với phân bố chuẩn có 95 % các giá trị nằm trong 2σ kể từ giá trị trung bình và 99,7 % các giá trị nằm trong phạm vi 3σ . Do đó, các kết quả với chỉ số z lớn hơn 2 nên được xem xét nguyên nhân bởi chỉ có 5 % giá trị đo đúng được dự kiến sai lệch với giá trị ấn định. Các kết quả với chỉ số z lớn hơn 3 được coi là không thỏa mãn do chỉ có 0,3 % giá trị đo đúng được dự kiến khác với giá trị ấn định (xem TCVN ISO/IEC 17043:2011, B.4).

8.3.6.2 Độ lệch chuẩn đích cho tính toán chỉ số z

Việc tính chỉ số z sử dụng một giá trị đích của độ lệch chuẩn. Độ lệch chuẩn đích định rõ khoảng biến thiên có thể chấp nhận giữa các phòng thử nghiệm trong mỗi phép thử cụ thể. Nên sử dụng cùng một độ lệch chuẩn đích cho tất cả các đợt thử kế tiếp của chương trình thử nghiệm thành thạo để có thể so sánh chỉ số z giữa đợt này với đợt khác. Một số phương pháp thiết lập độ lệch chuẩn đích được nêu chi tiết trong Tài liệu tham khảo [9], TCVN ISO/IEC 17043:2011, B.3 và ISO 13528.

8.3.6.3 Các kết quả đa giá trị trong hệ thống chỉ số z

Chênh lệch trong kết quả của các bên tham gia xuất phát từ sự khác biệt giữa các phòng thử nghiệm cũng khác biệt trong nội bộ phòng thử nghiệm. Độ biến thiên nội bộ phòng thử nghiệm hoặc phương sai phòng thử nghiệm là sự sai khác giữa các lần đo được thực hiện bởi cùng một phòng thử nghiệm, trên cùng mẫu thử và là một nét đặc trưng của phép kiểm tra vi sinh vật. Độ biến thiên nội bộ phòng thử nghiệm được đo bằng phương sai của độ lặp lại.

Khi một phòng thử nghiệm tham gia báo cáo kết quả nhiều giá trị cho một vật liệu thử đơn lẻ thì điều này có thể gây ra độ chệch tiềm tàng đến phần dữ liệu còn lại từ các đơn vị khác. Ví dụ: nếu 10 phân tích viên của cùng một phòng thử nghiệm cùng phân tích trên một mẫu mà mẫu này được pha loãng không chính xác ngay từ đầu thì cả 10 kết quả nói trên đều sai. Số kết quả sai này trở thành một tập con trong hệ thống dữ liệu thu được và có thể làm chệch tất cả kết quả khác. Để tránh độ chệch này thì chỉ nên đưa một kết quả báo cáo duy nhất từ mỗi phòng thử nghiệm vào phân tích tổng thể về phân bố dữ liệu.

Khi một phòng thử nghiệm tham gia chương trình thu được nhiều kết quả từ một mẫu PT đơn lẻ thì các kết quả này phải được báo cáo riêng rẽ và không phải là giá trị trung bình. Khi nhà tổ chức chương trình chỉ cho phép báo cáo một kết quả cho mỗi phòng thử nghiệm thì phải chọn kết quả riêng lẻ để báo cáo trước khi tiến hành phép thử và biết được các kết quả.

8.3.7 Các phương pháp đánh giá kỹ năng khác

8.3.7.1 Yêu cầu chung

Mặc dù chỉ số z được sử dụng rất phổ biến trong đánh giá các kết quả của chương trình PT cho các phương pháp đếm, các phương pháp đánh giá khác có thể thích hợp cho các chương trình đặc biệt.

Ví dụ: với các mẫu có số lượng vi sinh thấp (như nước uống) thì các đánh giá thống kê có thể dựa trên mô hình dự đoán biến ngẫu nhiên. Khi đó các số đếm cận biên "cao" hoặc "thấp" được xác định rõ bằng cách sử dụng công thức Poisson. Các kết quả cao hoặc thấp thỉnh thoảng có thể xuất hiện ngẫu nhiên trong bất kỳ phòng thử nghiệm nào, nhưng việc có nhiều kết quả cận biên cho thấy kỹ năng phân tích kém. Các ưu điểm và nhược điểm của một mô hình so với cách tiếp cận phân vị để đánh giá thống kê được đề cập trong Tài liệu tham khảo [17].

Với các chương trình PT dự kiến có số đếm cao thì quy tắc $0,5 \log_{10}$ hoặc cách tiếp cận phân vị có thể được sử dụng, nhưng cần sử dụng phương pháp độ lệch tuyệt đối trung vị cho các chương trình có ít phòng thử nghiệm tham gia. Các nội dung này được tóm lược trong 8.3.7.2 đến 8.3.7.4.

8.3.7.2 Sử dụng quy tắc $0,5 \log_{10}$

Một hệ thống tính điểm dựa vào quy tắc $0,5 \log_{10}$ có thể được sử dụng cho phép đếm khuẩn lạc (theo Tài liệu tham khảo [13]). Về cơ bản, khoảng tin cậy 95 % xung quanh giá trị trung bình số đếm nhìn chung không lớn hơn $\pm 0,5 \log_{10}$ cfu. Các thủ tục kiểm soát chất lượng nội bộ đối với các phòng thử nghiệm vi sinh thường yêu cầu phép đếm lặp để thấy được sự phù hợp với mức không vượt quá $0,5 \log_{10}$ đơn vị để chứng minh việc kiểm soát tốt quá trình. Hệ thống này được áp dụng cho kết quả của các bên tham gia, theo đó tất cả kết quả nằm trong phạm vi $\pm 0,5 \log_{10}$ đơn vị từ giá trị trung vị của các bên tham gia được xem là có thể chấp nhận và được tính điểm tối đa. Quy tắc này cho phép điểm của các bên tham gia được cải thiện theo thời gian nếu xét về tổng thể chất lượng phép đếm của họ được cải tiến.

Quy tắc $\pm 0,5 \log_{10}$ dựa trên chuẩn mực vi sinh vật nhưng cũng có giá trị thống kê vì nếu số đếm dự kiến trên một đĩa là 10 khuẩn lạc và các vi sinh vật phân bố ngẫu nhiên thì 95 % các kết quả phải nằm trong khoảng từ 3 đến 17 khuẩn lạc. Trên thang logarit thập phân với số đếm trung vị kỳ vọng là 1 thì giới hạn dưới là 0,47 và giới hạn trên là 1,23, nghĩa là giới hạn trên và dưới nằm trong $0,5 \log_{10}$ đơn vị. Do vậy, một kết quả nằm trong $\pm 0,5 \log_{10}$ đơn vị của giá trị kỳ vọng cần xem là có thể chấp nhận được.

8.3.7.3 Sử dụng phân vị

Phân vị có thể được dùng để nhận dạng các giá trị bất thường trong phép thử định lượng khi có nhiều hơn hoặc bằng 50 đơn vị tham gia tiến hành định lượng bằng cách đếm khuẩn lạc. Cách này đòi hỏi tính toán phân vị thứ 5, thứ 10, thứ 90 và thứ 95 trong phân bố kết quả của các bên tham gia (lần lượt là C5, C10, C90 và C95). C5 và C10 cần được làm tròn xuống đến giá trị $0,05 \log_{10}$ đơn vị gần nhất (ví dụ: làm tròn 2,23 thành 2,20), trong khi đó C90 và C95 cần được làm tròn lên (ví dụ: làm tròn 3,36 thành 3,40). Sau đây ví dụ về cách tính điểm (như trường hợp đếm khuẩn lạc hiếu khí):

- Các kết quả nằm giữa C10 và C90 (khoảng chấp nhận): Điểm = 2
- Các kết quả nằm giữa C5 và C10 hoặc giữa C90 và C95: Điểm = 1
- Các kết quả nằm dưới C5 hoặc trên C95 Điểm = 0

Việc áp dụng quy tắc $0,5 \log_{10}$ có thể mở rộng khoảng chấp nhận và do đó có thể nâng hạng điểm đã tính cho một vài kết quả trong C5, C10, C90 và C95.

Phương pháp phân vị ổn định và không phụ thuộc vào phân bố thực của số đếm logarit thập phân như với phân bố chuẩn. Nó cho phép diễn đạt rõ ràng kết quả đánh giá kỹ năng phân tích.

Nếu số lượng phòng thử nghiệm tham gia một chương trình PT ít hơn 50 hoặc số đơn vị tham gia báo cáo kết quả định lượng một thông số cụ thể ít hơn 50 thì cần sử dụng các giá trị độ lệch tuyệt đối trung vị (MAD) (xem 8.3.7.4) thay cho phân vị.

8.3.7.4 Sử dụng độ lệch tuyệt đối trung vị (MAD) từ các giá trị trung vị

Phương pháp MAD được sử dụng để xác định số đếm bất thường khi có ít hơn 50 đơn vị tham dự thực hiện một phép thử định lượng. Không nên sử dụng phương pháp phân vị vì số kết quả thu được nhỏ hơn 50 không cung cấp đủ dữ liệu để tính toán các giá trị có ý nghĩa cho C5, C10, C90, và C95. Các giá trị MAD cung cấp phương pháp thô để tính khoảng chấp nhận khi đánh giá kết quả của các bên tham gia và tính điểm. Phương pháp phân tích này yêu cầu tính độ chênh lệch trung vị từ trung vị đối với từng kết quả, sau đó nhân với 1,4826 để thu được giá trị ước tính thô về độ lệch chuẩn (giá trị MAD), σ_{MAD} .

Ví dụ về cách tính điểm sử dụng các giá trị MAD được cho dưới đây:

- Các kết quả trong vùng giá trị trung vị của các bên tham gia $\pm 2\sigma_{MAD}$: Điểm = 2
- Các kết quả nằm giữa $\pm 2\sigma_{MAD}$ và $\pm 2,58\sigma_{MAD}$: Điểm = 1
- Các kết quả nằm ngoài $\pm 2,58\sigma_{MAD}$ Điểm = 0

Khi sử dụng phân vị thì giới hạn dưới cần làm tròn xuống đến giá trị $0,05 \log_{10}$ gần nhất và giới hạn trên cần làm tròn lên giá trị $0,05 \log_{10}$ gần nhất.

Lưu ý rằng trừ khi quy tắc $0,5 \log_{10}$ được áp dụng, nên có khoảng 5 % phòng thử nghiệm nằm ngoài vùng $\pm 2\sigma_{MAD}$ và 1 % nằm ngoài vùng $\pm 2,58\sigma_{MAD}$ (giả định phân bố chuẩn của số đếm logarit thập phân và không có các giá trị quá bất thường).

Phương pháp MAD nên sử dụng cho các chương trình PT mới khi có ít hơn 100 đơn vị tham gia.

8.3.7.5 Các xem xét đặc biệt đối với phương pháp đếm số có xác suất lớn nhất

Phương pháp thử được dùng để xác định giá trị MPN có độ biến thiên nội tại lớn hơn các phương pháp đếm khuẩn lạc, do đó nó thường chỉ được xem là phương pháp bán định lượng. Tuy nhiên, đôi khi cần phát hiện và ước tính mật độ vi sinh vật được dự kiến là thấp, đặc biệt khi các vi sinh vật có thể bị ức chế (ví dụ: do ảnh hưởng của quá trình xử lý hoặc làm đông lạnh). Phương pháp MPN cũng được quy định trong các văn bản pháp quy hoặc yêu cầu kiểm tra vi sinh vật đối với một vài sản phẩm như các sản phẩm từ sữa và động vật thân mềm hai mảnh vỏ và các loại thủy sản có vỏ khác.

Bất kỳ phương pháp nào đánh giá kết quả xác định các giá trị MPN của các bên tham gia cần tính đến độ biến thiên nội tại của phương pháp MPN và giả định rằng mẫu thử đã được trộn kỹ trước khi phân tích.

Đối với phương pháp 3 nồng độ x 5 ống, độ lệch chuẩn của một kết quả \log_{10} MPN là xấp xỉ 0,24, miễn là các kết quả không cho thấy các tổ hợp ống "ngoại lai", ví dụ: các tổ hợp ống 3, 0, 0 đến 5, 5 và 2 [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

TCVN 9331:2012

Đối với phương pháp 3 nồng độ x 3 ống thì độ lệch chuẩn của kết quả \log_{10} MPN là xấp xỉ 0,32, miễn là các kết quả không cho thấy các tổ hợp ống "ngoại lai", ví dụ tổ hợp ống 2, 0, 0 và 3, 3, 1.

Điều này có nghĩa là: trong trường hợp hoàn hảo, độ biến thiên giữa các phòng thử nghiệm không quá lớn thì 95 % kết quả cần nằm trong khoảng $\pm 2\sigma$ và hơn 99 % nằm trong khoảng $\pm 3\sigma$, trong đó σ là độ lệch chuẩn.

Tuy nhiên, trong thực tế sẽ có biến thiên nhất định giữa các phòng thử nghiệm. Việc phân tích một số tập hợp dữ liệu cho thấy sự thay đổi trên làm tăng phương sai khoảng 2,5 lần (và do đó làm tăng độ lệch chuẩn lên 1,58 lần).

Vi vậy giới hạn chấp nhận kết quả xác định MPN của các bên tham gia cần nâng lên thành $\pm 3\sigma$ và $\pm 5\sigma$ (xem Bảng 1).

Bảng 1 – Giới hạn chấp nhận

Giới hạn chấp nhận	Phương pháp 3 x 3 ống	Phương pháp 3 x 5 ống
$\pm 3\sigma$	$\pm 0,96 \log_{10}$ (gấp 9,1 lần)	$\pm 0,72 \log_{10}$ (gấp 5,2 lần)
$\pm 5\sigma$	$\pm 1,60 \log_{10}$ (gấp 39,8 lần)	$\pm 1,20 \log_{10}$ (gấp 15,8 lần)

Quy tắc $0,5 \log_{10}$ không nên áp dụng cho các kết quả MPN do tính biến thiên của phương pháp.

Đối với phương pháp MPN, cũng có thể kiểm tra xem các tổ hợp ống và dung dịch pha loãng được báo cáo có phù hợp với giá trị MPN có được bằng cách tra bảng [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

Nếu chương trình PT hoặc văn bản pháp quy yêu cầu các giá trị MPN phải được xác định song hành, các kết quả có thể được so sánh và nếu các tổ hợp ống đáng tin cậy thì chênh lệch giữa hai kết quả này không được sai khác hơn $2,58 \times \sqrt{2} \times 0,24 = 0,88$ đối với phương pháp 3 x 5 ống và $2,58 \times \sqrt{2} \times 0,32 = 1,17$ đối với phương pháp 3 x 3 ống, tính theo đơn vị logarit thập phân.

Nếu so sánh hai phân bố với hai kết quả lặp lại cho mỗi phân bố thì trung bình của hai giá trị không được sai khác hơn $2,58 \times 0,24 = 0,62$ đối với phương pháp 3 x 5 ống và $2,58 \times 0,32 = 0,83$ đối với phương pháp 3 ống x 3 nồng độ, tính theo đơn vị logarit thập phân.

8.3.8 Đánh giá kỹ năng dài hạn

8.3.8.1 Yêu cầu chung

Đánh giá kỹ năng trong các chương trình thử nghiệm thành thạo thường bó gọn trong khuôn khổ đánh giá kết quả từ các đợt thử đơn lẻ, nhưng khi mở rộng phạm vi, việc đánh giá trong một khoảng thời gian dài hơn có thể có ích. Có một số hướng dẫn khi áp dụng kiểu đánh giá này cho các chương trình đánh giá chất lượng từ bên ngoài để hoàn thiện phương pháp.

Bất kể phương pháp nào đánh giá kỹ năng lâu dài phải đảm bảo rằng các phòng thử nghiệm thực hiện phép thử định lượng không bị nhận dạng ngẫu nhiên là có "kỹ năng kém" do số lượng vi sinh vật trong mẫu mà họ nhận được.

Các số đếm "thấp" và "cao" cần được định rõ theo những quy tắc khách quan (ví dụ: sử dụng mô hình Poisson đối với số đếm thấp, phương pháp phân vị hoặc các phương pháp khác đối với số đếm cao), sau đó được dùng để xác định các phòng thử nghiệm có báo cáo kết quả thường xuyên hơn dự kiến hay không.

Nhà tổ chức chương trình nên khuyến khích các bên tham gia vận dụng các nhận xét chuyên môn của chính họ để đánh giá thông tin được cung cấp trong báo cáo, từ đó tự đánh giá kỹ năng của mình. Nhà tổ chức có thể gợi ý cho các bên tham gia các cách khác nhau về thực hiện tự đánh giá phòng thử nghiệm nhưng họ không nên ấn định các tiêu chí về tự đánh giá cho từng phòng thử nghiệm; tốt hơn, các tiêu chí này nên được lập ra bởi mỗi phòng thử nghiệm tham gia, dựa trên những gì họ tin là có ý nghĩa về vi sinh học xét theo công việc hằng ngày của họ và các yêu cầu của khách hàng.

8.3.8.2 Đánh giá số đếm thấp

Nếu ngẫu nhiên là yếu tố duy nhất có liên quan thì các số đếm vùng biên cần được phân bố ngẫu nhiên. Các kết quả này có thể được xem xét kỹ lưỡng để xác định độ phân tán của các kết quả vùng biên, giữa các phòng thử nghiệm qua một loạt mẫu (ví dụ: sử dụng phép thử Q theo Cochran).

Nếu chúng không phân bố ngẫu nhiên thì có thể tiến hành phân tích giai đoạn 2 để xác định phân bố dự kiến của các số đếm vùng biên trong số các phòng thử nghiệm có báo cáo số liệu này, nếu các kết quả đơn giản chỉ là do sự thay đổi tự nhiên giữa các mẫu và không do ảnh hưởng từ kỹ năng phân tích của phòng thử nghiệm. Từ đó, sự trái ngược giữa số kỳ vọng của các phòng thử nghiệm và số thực tế quan sát được đã chỉ ra các phòng thử nghiệm có thể có vấn đề về kinh nghiệm. Ví dụ về đánh giá kỹ năng phân tích đối với mẫu có số lượng vi sinh thấp được nêu trong Bảng 2.

Bảng 2 – Các số kỳ vọng và quan sát được của tập hợp các kết quả giả định phân bố ngẫu nhiên của các kết quả thấp (từ một phân bố của mức mật độ thấp *Clostridium perfringens* trong các mẫu nước uống, khi mà biến thiên về số lượng giữa các mẫu thử có thể vượt quá sự biến đổi trong kỹ năng phân tích của phòng thử nghiệm)

Số thấp	Quan sát được	Kỳ vọng
0	58	58
1	32	48,56
2	18	16,94
3	14	3,15
4	3	0,33
5	2	0,02
Tổng số	127	127

TCVN 9331:2012

Một hoặc hai kết quả có thể do ngẫu nhiên; ba có thể không do ngẫu nhiên; bốn hoặc hơn không thể là do ngẫu nhiên và quy trình cần được kiểm tra lại.

8.3.8.3 Đánh giá số đếm cao

Đánh giá các số đếm cao dựa vào các nguyên tắc tương tự, nhưng kết quả của các bên tham gia ít biến động hơn do sự khác nhau trong thành phần mẫu được dự kiến.

Có thể đánh giá kỹ năng trong thời gian dài với trên 12 mẫu, ví dụ bằng phương pháp phân vị, cho phép tính tối đa là 24 điểm. Các đơn vị tham gia được giao một đích kỹ năng ít nhất là 70 %. Nếu bỏ qua quy tắc $0,5 \log_{10}$ và giả định rằng tất cả các bên tham gia có khả năng đạt đến kỹ năng tương đương thì bằng cách sử dụng lý thuyết đa thức, có thể thấy rằng xác suất để một phòng thử nghiệm nhận được một điểm số tích lũy ít hơn 70 % của điểm tối đa có thể là 5,2 %. Điều này có nghĩa rằng trong các điều kiện như trên thì xấp xỉ 1 trong 20 đơn vị tham gia có thể được nhận dạng không chính xác là "kỹ năng kém". Trong thực tế, kỹ năng của các đơn vị không tương đương và một vài phòng thử nghiệm thiếu kinh nghiệm đối với các phép thử mà họ thực hiện, do đó xác suất về một kỹ năng đạt yêu cầu bị nhận định nhầm là "kém" thì thấp hơn nhiều so với giá trị trên. Hơn nữa, việc sử dụng quy tắc $0,5 \log_{10}$ làm giảm xác suất này đến ít hơn 0,1 %.

Ví dụ thực tế về đánh giá kỹ năng trong thời gian dài qua cách sử dụng các bảng thống kê được nêu trong Phụ lục C.

8.4 Đánh giá các phương pháp định tính

8.4.1 Yêu cầu chung

Đối với các nghiên cứu so sánh liên phòng thử nghiệm trong đó sử dụng một hoặc nhiều phương pháp định tính thì kết quả là rõ ràng, có hoặc không, phát hiện hoặc không phát hiện.

Các phương pháp phân tích thống kê đối với dạng kết quả này bị hạn chế, nhưng nhiều tùy chọn khác nhau đã được đề cập chẳng hạn như LOD_{50} , các đánh giá về mức phù hợp, tương hợp và tỷ lệ chính xác, và cách tiếp cận tối ưu vẫn đang được xem xét.

8.4.2 Kỹ năng của từng phòng thử nghiệm đơn lẻ

Một phương pháp đơn giản để các phòng thử nghiệm tham gia tự đánh giá là ghi lại số các kết quả dương tính và âm tính họ thu được cùng với số kết quả dương tính và âm tính được kỳ vọng. Thông tin này cần được kết nối với các ghi chép về mật độ vi sinh đích trong các mẫu để đánh giá kỹ năng phân tích và đồng thời cung cấp số liệu hiện hành về giới hạn phát hiện của phương pháp tại mỗi phòng thử nghiệm.

Viết kết quả của phép thử là "có" hoặc "không" nên cần thử nhiều mẫu để đánh giá kỹ năng của từng phòng thử nghiệm trong chương trình PT. Mỗi đơn vị tham gia nên thử ít nhất tổng cộng 18 mẫu. 18 mẫu này bao gồm lặp lại 6 lần ở 3 mức nhiễm khác nhau trong mẫu. Ba mức đó là: âm tính (kiểm tra sự xuất hiện của dương tính giả, ví dụ: nhiễm chéo); mức mật độ thấp (nghĩa là các mẫu bị nhiễm tại hoặc hơi cao hơn giới hạn phát hiện của phương pháp sử dụng, lý tưởng nhất nên có mức nhiễm mà trong đó 50 % mẫu được tìm thấy dương tính và 50 % là âm tính (LOD_{50}) và mức cao (mức này nên gấp 10 lần so với mức thấp và đại diện cho mức nồng độ tại đó tất cả mẫu thử phải cho dương tính).

Diễn giải dữ liệu theo cách đơn giản:

- đối với mức âm tính: tất cả các mẫu cần phải là âm tính;
- đối với mức cao: tất cả các mẫu cần phải dương tính;
- đối với mức thấp: có thể tính toán (xem Bảng 3) bằng cách sử dụng phân bố nhị thức và tỷ lệ phần trăm mẫu được tìm thấy dương tính (có thể nhận một giá trị tham chiếu từ nhà tổ chức hoặc một số ước tính tốt nhất từ kết quả của tất cả các bên tham gia) với mức tin cậy 95 %.

Bảng 3 – Xác suất tìm thấy một số nhất định dương tính trong số 6 mẫu được thử, tính theo phần trăm trung bình từ các mẫu dương tính (phân bố nhị thức)

Số dương tính từ sáu mẫu	Phần trăm trung bình dương tính								
	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %
0	53,1 %	26,2 %	11,8 %	4,7 %	1,6 %	0,4 %	0,1 %	0,0 %	0,0 %
1	35,4 %	39,3 %	30,3 %	18,7 %	9,4 %	3,7 %	1,0 %	0,2 %	0,0 %
2	9,8 %	24,6 %	32,4 %	31,1 %	23,4 %	13,8 %	6,0 %	1,5 %	0,1 %
3	1,5 %	8,2 %	18,5 %	27,6 %	31,3 %	27,6 %	18,5 %	8,2 %	1,5 %
4	0,1 %	1,5 %	6,0 %	13,8 %	23,4 %	31,1 %	32,4 %	24,6 %	9,8 %
5	0,0 %	0,2 %	1,0 %	3,7 %	9,4 %	18,7 %	30,3 %	39,3 %	35,4 %
6	0,0 %	0,0 %	0,1 %	0,4 %	1,6 %	4,7 %	11,8 %	26,2 %	53,1 %

TCVN 9331:2012

VÍ DỤ: Để sử dụng Bảng 3, trước hết cần biết tỷ lệ dương tính trung bình. Ở đây, giả định tỷ lệ này là 30 %, có nghĩa là khoảng một trong ba mẫu có chứa vi sinh vật đích. Vì chỉ có 30 % các mẫu có vi sinh vật đích, nên dường như có một số mẫu có thể không chứa vi sinh vật đích trong khi có 6 mẫu được thử chẳng hạn.

Bảng 3 cho thấy rằng xác suất để có được một tập hợp sáu mẫu bao gồm bốn mẫu dương tính và hai mẫu âm tính là 6 %. Điều này không chắc xảy ra nhưng vẫn có thể chấp nhận được khi giả định mức tin cậy là 95 %. Tổng xác suất tìm thấy 0, 1, 2, 3 hoặc 4 mẫu dương tính là 99,0 % (11,8 + 30,3 + 32,4 + 18,5 + 6,0). Trong trường hợp này, 99 % là giá trị nhỏ nhất ở trên 95 % (là giới hạn độ tin cậy). Bỏ đi 4 kết quả dương tính thành 93 %, tỷ lệ này thấp hơn mức tin cậy 95 %.

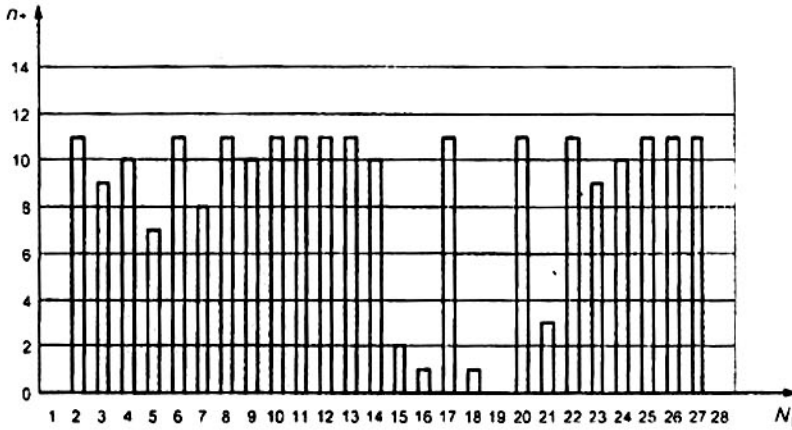
Theo cách lập luận khác thì xác suất để tìm thấy cả 6 trong 6 mẫu đều dương tính chỉ là 0,1 %. Điều này chắc chắn không xảy ra chỉ do ngẫu nhiên. Khi độ không đảm bảo được đặt ra ở mức tối đa là 5 %, (100 % – 95 % độ tin cậy), tỷ lệ trên sẽ nằm trong phạm vi giới hạn này. Cũng tương tự như vậy là tình huống có 5 hoặc 6 mẫu trong tổng số 6 mẫu thử được tìm thấy dương tính. Tổng các xác suất trên là 1,1 %, vẫn thấp hơn giới hạn 5 %. Chỉ khi tình huống trên có thêm 4 mẫu nữa trong 6 mẫu được tìm thấy dương tính thì sẽ làm cho độ không đảm bảo vượt quá giới hạn 5 %. Khi mức tối đa được thiết lập ở 5 %, tình huống có 5 hoặc 6 mẫu dương tính trong tổng 6 mẫu được thử sẽ được xem như một kết quả không mong đợi.

CHÚ THÍCH Tại LOD₅₀, 50 % trong số mẫu thử được tìm thấy dương tính. Về mặt lý thuyết [có tính đến phương pháp được sử dụng có khả năng phát hiện một vi sinh vật đơn lẻ trong một mẫu và giả định rằng có một phân bố đồng nhất (Poisson) giữa các mẫu], mức nhiễm trung bình các mẫu được dự kiến là 0,7 vi sinh vật/mẫu để đạt được LOD₅₀. Trong thực nghiệm, sự phân bố đồng đều một cách lý tưởng thường không đạt được và theo cách tương đối, nên có nhiều trong số các mẫu không chứa bất kỳ một vi sinh vật (sống) nào hơn là trông đợi vào một sự phân bố đồng đều thực sự. Để nhận được 50 % các mẫu dương tính, cần tăng mức nhiễm trung bình lên, dựa trên kinh nghiệm về vật liệu dùng thử nghiệm.

8.4.3 Chương trình so sánh kỹ năng của các phòng thử nghiệm

Để so sánh kỹ năng phân tích của một phòng thử nghiệm so với các phòng thử nghiệm khác thì nhà tổ chức có thể tính toán số lượng (hoặc tỉ lệ phần trăm) dương tính đối với các mức độ nhiễm vi sinh vật đích được tìm thấy cho mỗi mẫu thử bởi mỗi phòng thử nghiệm (được báo cáo theo mã của phòng thử nghiệm). Ví dụ cụ thể được nêu trong Hình 2. Trong nghiên cứu này, 28 phòng thử nghiệm tham gia (được chỉ thị theo mã phòng thử nghiệm trong trục N_L của Hình 2). Mỗi phòng thử nghiệm phân tích 22 mẫu phân gà, đã được gây nhiễm nhân tạo với vật liệu chuẩn chứa hai typ vi khuẩn *Salmonella* khác nhau ở 4 mức nhiễm khác nhau (dao động từ 10 đến 500 cfu/mẫu). Trong Hình 2, các kết quả được tổng hợp đối với mẫu có mức nhiễm thấp ($n = 14$). Số mẫu dương tính mà các phòng thử nghiệm tham gia thu được dao động từ 0 đến 11 mẫu (trục n , trong Hình 2).

Ngoài cách mô tả rõ ràng các kết quả như trên, có thể tính toán các tỉ lệ đặc hiệu, tỉ lệ chọn lọc và tỉ lệ chính xác cho mỗi mức độ nhiễm của các mẫu (theo ISO 16140⁽⁴⁾). Các tỉ lệ này có thể được tính toán cho từng phòng thử nghiệm và cho kết quả từ tất cả các phòng thử nghiệm tham gia.



CHÚ DẪN:

N_L mã phòng thử nghiệm

n_+ số phát hiện dương tính

Hình 2 – Số lượng dương tính phân lập bởi mỗi phòng thử nghiệm đối với tất cả các mẫu có mức vi sinh thấp được thử nghiệm ($n = 14$)

Độ đặc hiệu, r_{SP} , được tính theo công thức:

$$r_{SP} = \frac{n_-}{E(n_{-tot})} \times 100\%$$

trong đó:

n_- là số kết quả âm tính được tìm thấy;

$E(n_{-tot})$ là tổng số mẫu âm tính kỳ vọng.

Độ chọn lọc, r_{SE} , được tính theo công thức:

$$r_{SE} = \frac{n_+}{E(n_{+tot})} \times 100\%$$

trong đó:

n_+ là số kết quả dương tính được tìm thấy;

$E(n_{+tot})$ là tổng số mẫu dương tính kỳ vọng.

Độ chính xác, r_{AC} , được tính theo công thức:

$$r_{AC} = \frac{n_+ + n_-}{n_{tot}} \times 100\%$$

trong đó: n_{tot} là tổng số mẫu.

Việc đánh giá như trên chỉ có ý nghĩa nếu được liên kết với số lượng vi sinh vật đích có mặt trong mẫu.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Ví dụ về các chi tiết được đưa vào kế hoạch của chương trình PT

Kế hoạch chương trình PT – Tóm tắt chương trình

Tên chương trình:	Chương trình kiểm tra thực phẩm
Dạng chương trình:	Vi sinh thực phẩm
Mục đích:	Cung cấp mẫu đánh giá chất lượng từ bên ngoài đối với các phép thử thông thường trong các phòng thử nghiệm vi sinh thực phẩm
Tiêu chí lựa chọn đơn vị tham gia:	Phòng thử nghiệm vi sinh thực phẩm có trang thiết bị phù hợp để thao tác với các vi sinh vật gây bệnh thuộc cấp nguy hiểm 1 và 2
Các phòng thử nghiệm mục tiêu:	Các phòng thử nghiệm vi sinh thuộc tư nhân và khu vực công
Luật quy định:	Quy định của EU số 882/2004 liên quan đến kiểm soát pháp quyền về thực phẩm
Dạng mẫu:	Vi sinh vật được đông khô, đóng trong các lọ thủy tinh nhỏ
Các phép thử:	<p>Phát hiện/không phát hiện:</p> <p><i>Campylobacteria</i> spp.</p> <p><i>Escherichia coli</i> O157</p> <p><i>Salmonella</i> spp.</p> <p>Định lượng:</p> <p>Vi sinh vật hiếu khí</p> <p><i>Bacillus cereus</i></p> <p><i>Clostridium perfringens</i></p> <p><i>Coliforms</i></p> <p><i>Enterobacteriaceae</i></p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Listeria monocytogenes</i></p> <p>Staphylococci dương tính với coagulase</p>

Kế hoạch chương trình PT – Tóm tắt chương trình (kết thúc)

Các tiêu chí về thành phần mẫu:	Có mặt hệ vi sinh vật nền giống như tồn tại trong các mẫu thực phẩm thật và đưa đến thách thức thực sự cho các quy trình thử vi sinh thực phẩm thông dụng
Số lượng đích các đơn vị tham gia:	Lớn hơn 200
Số đợt phân phối hàng năm:	Sáu (6)
Số mẫu phân phối mỗi đợt:	Hai (2)
Nhà thầu phụ bên ngoài:	Không
Chuyên gia kỹ thuật:	Tên từng người
Thử nghiệm kiểm soát chất lượng từng mẻ mẫu:	Tên phòng thử nghiệm và các phương pháp tiêu chuẩn được dùng. 25 mẫu từ mỗi mẻ được kiểm tra về tất cả các chỉ tiêu đã định
Phương pháp thống kê:	Trung vị đồng thuận (phương pháp đếm) Phân vị để xác định giá trị bất thường
Tính điểm:	Có
Tiêu chí chấm điểm:	Ba điểm được tính cho mỗi mẫu: i) kiểm tra vi sinh gây bệnh; ii) đếm khuẩn lạc hiếu khí; iii) các vi sinh vật chỉ thị
Đánh giá kỹ năng liên tục:	Có
Tiêu chí xác định "kết quả kém":	Ít hơn 70 % điểm tối đa có thể qua 6 đợt phân phối mẫu
Tiếp cận hỗ trợ tích cực bởi nhà tổ chức đối với "nơi có kết quả kém":	Có
Phương pháp đánh giá:	Có – chỉ có tính chất chỉ thị

Điều phối viên chương trình hoặc người được ủy quyền ký/ngày

Phê chuẩn bởi ban lãnh đạo:	Ngày
Tài liệu đề xuất được ủy quyền:	Ngày
Trị giá được duyệt:	Ngày
Ngày công nhận:	ngày
Các nhận xét khác:	Xem xét tại cuộc họp ban lãnh đạo

Phụ lục B
(Tham khảo)

Các phương pháp kiểm tra mức sai khác giữa các phần mẫu của vật liệu cần thử

B.1 Phép thử T_1 - T_2

Phép thử này nên được sử dụng cho các trường hợp có ít vi sinh vật hiện diện trong các phần chia từ vật liệu thử (TM), ở mức từ 35 đến 40 cfu/đĩa, hoặc trường hợp không thể ấn định được "độ lệch chuẩn mục tiêu" để đánh giá độ đồng nhất đạt được.

Độ biến thiên giữa các phần mẫu phân tích của một đơn vị (hoàn nguyên) từ TM, T_1 , và giữa các phần mẫu phân tích từ các đơn vị khác (đã hoàn nguyên) của mỗi mẻ TM, T_2 , được kiểm tra theo các cách khác nhau. Các chi tiết được đề cập trong Tài liệu tham khảo [12], nhưng một nội dung tóm tắt được nêu dưới đây.

Áp dụng phép thử thống kê T_1 để xác định độ biến thiên giữa các phần mẫu phân tích từ một đơn vị (hoàn nguyên) của một TM (kiểm tra lặp lại):

$$T_1 = \sum_i \sum_j \left[\frac{(z_{ij} - \frac{z_{i+}}{J})^2}{\frac{z_{i+}}{J}} \right] \quad (\text{B.1})$$

trong đó:

z_{ij} là số cfu trong một phần mẫu phân tích j của đơn vị thứ i ;

z_{i+} là tổng số cfu trong tất cả các phần mẫu phân tích của đơn vị i

$$z_{i+} = \sum_j z_{ij} \quad (\text{B.2})$$

J là số các phần mẫu phân tích từ mỗi đơn vị mẫu.

Áp dụng phép thử thống kê T_2 để xác định độ biến thiên giữa các phần mẫu phân tích từ những đơn vị khác nhau (hoàn nguyên) của một mẻ TM:

$$T_2 = \sum_i \left[\frac{(z_{i+} - \frac{z_{++}}{I})^2}{\frac{z_{++}}{I}} \right] \quad (\text{B.3})$$

trong đó:

z_{++} là tổng số (cfu) trong tất cả các phần mẫu phân tích từ các đơn vị được kiểm tra của một mẻ TM

$$z_{++} = \sum_i \left(\sum_j z_{ij} \right)$$

i là số các đơn vị mẫu được kiểm tra.

Nếu áp dụng phân bố Poisson thì T_1 và T_2 tuân theo một phân bố χ^2 với các bậc tự do lần lượt là $l(J-1)$ và $l-1$. Trong trường hợp này, các giá trị kỳ vọng của T_1 và T_2 bằng số bậc tự do. Vì vậy,

$\frac{T_1}{l(J-1)}$ và $\frac{T_2}{l-1}$ được kì vọng bằng 1.

Đối với độ biến thiên giữa các đơn vị trong một mẻ TM, theo phân bố Poisson là độ biến thiên nhỏ nhất theo lý thuyết có thể đạt được. Tuy nhiên, người ta dự kiến có sự phân tán mạnh và $\frac{T_2}{l-1}$ thì hầu như là lớn hơn 1 (Tài liệu tham khảo [12]). Một mức biến thiên chấp nhận được giữa các đơn vị trong một mẻ TM là $\frac{T_2}{l-1} \leq 2$.

VÍ DỤ

Các dữ liệu được cho dưới đây:

Đơn vị:	số đếm (kép)	
1	$z_{11} = 45$	$z_{12} = 49$
2	$z_{21} = 33$	$z_{22} = 42$
3	$z_{31} = 40$	$z_{32} = 42$
$l = 3$ (ba đơn vị)		
$J = 2$ (lặp lại hai lần)		
	$z_{1+}/J = (45+49)/2 = 94/2 = 47$	
	$z_{2+}/J = (33+42)/2 = 75/2 = 37,5$	
	$z_{3+}/J = (40+42)/2 = 82/2 = 41$	

$$T_1 = \frac{(45 - 47)^2}{47} + \frac{(49 - 47)^2}{47} + \frac{(33 - 37,5)^2}{37,5} + \frac{(42 - 37,5)^2}{37,5} + \frac{(40 - 41)^2}{41} + \frac{(42 - 41)^2}{41}$$

$$= 0,085 + 0,085 + 0,54 + 0,54 + 0,024 + 0,024$$

$$= 1,298$$

T_1 cần tuân theo phân bố χ^2 với $(J - 1) = 3 \times (2 - 1) = 3$ bậc tự do.

Kiểm tra hai phía ở mức tin cậy 95 %, giới hạn dưới và giới hạn trên đối với phân bố này, với 3 bậc tự do, lần lượt là 0,22 và 9,3. Giá trị T_1 đã tính (1,298) tuân theo các tiêu chí này.

$$\sum z_i = 45 + 49 + 33 + 42 + 40 + 42 = 251$$

$$\sum z_i / I = 251/3 = 83,7$$

$$T_2 = \frac{(94 - 83,7)^2}{83,7} + \frac{(75 - 83,7)^2}{83,7} + \frac{(82 - 83,7)^2}{83,7}$$

$$= 1,268 + 0,904 + 0,034$$

$$= 2,206$$

Mức biến thiên có thể chấp nhận cho một mẻ mẫu là: $T_2/(I - 1) \leq 2$.

Ở đây, $T_2/(I - 1) = 2,206/(3 - 1) = 1,103$ và như vậy, tuân thủ tiêu chí chấp nhận một mẻ mẫu.

B.2 Kiểm tra mức độ đồng nhất

Kiểm tra độ đồng nhất được khuyến nghị đối với các trường hợp mà trong các phần mẫu thử có chứa một lượng lớn vi sinh vật (nhiều hơn 35 đến 40 cfu/đĩa) và đã có sẵn một độ lệch chuẩn đích σ_p , thể hiện mức hiệu xuất dự kiến của các đơn vị tham gia PT. Phép kiểm tra này dựa trên phép thử "độ đồng nhất" trong Tài liệu tham khảo [11].

Với một tập hợp các phần mẫu thử được phân tích kép và các kết quả được thể hiện dưới dạng đơn vị log, thì kết quả kiểm tra sẽ đạt nếu mức sai khác giữa các phần mẫu, S_{sam}^2 , thỏa mãn điều kiện (B.5):

$$s_{sam}^2 \leq F_1(0,3\sigma_p)^2 + F_2s_{an}^2$$

trong đó, s_{an}^2 là độ biến thiên phân tích. Phép kiểm tra này không chắc chắn bằng phép thử $T_1 - T_2$ dẫn đến quyết định loại bỏ một vật liệu không đồng nhất hoàn toàn (các kết quả phân tích tuân theo phân bố Poission), nhưng vật liệu này lại đủ độ đồng nhất để có thể sử dụng cho một đợt thử nghiệm thành thạo với một độ lệch chuẩn đích là σ_p . Điều này là do các mẫu được chấp nhận trừ khi có biểu hiện với mức tin cậy cao (95 %) rằng, sự phù hợp với mục đích sử dụng tiêu chuẩn $\sigma_{sam} > 0,3 \sigma_p$, trong đó σ_{sam} là độ lệch chuẩn từ đó S_{sam} được ước tính.

VÍ DỤ:

Các kết quả định lượng thu được từ phân tích kép 10 phần mẫu thử, tính độ chênh lệch D, tổng S và D^2 ở dạng logarit thập phân, cho mỗi nhóm kết quả (Bảng 1).

Phân mẫu	Phân tích 1	Phân tích 2	Log - phân tích 1	Log - phân tích 2	D	S	D ²
1	35	51	1,5441	1,7076	-0,1635	3,2516	0,026733
2	52	46	1,7160	1,6628	0,0532	3,3788	0,002835
3	35	33	1,5441	1,5185	0,0256	3,0626	0,000653
4	53	38	1,7243	1,5798	0,1445	3,3041	0,020878
5	30	40	1,4771	1,6021	-0,1249	3,0792	0,015610
6	33	30	1,5185	1,4771	0,0414	2,9956	0,001713
7	41	60	1,6128	1,7782	-0,1654	3,3909	0,027346
8	35	55	1,5441	1,7404	-0,1963	3,2844	0,038532
9	68	67	1,8325	1,8261	0,0064	3,6586	0,000041
10	52	60	1,7160	1,7782	-0,0621	3,4942	0,003362

Tính tổng của D^2 và chia cho hai lần của số phần mẫu. Đây là trung bình tổng bình phương của chênh lệch trong một mẫu, \bar{S}_w

Trong trường hợp này, $\bar{S}_w = 0,1382/20 = 0,00691$.

Tính phương sai của \bar{S}_w và chia kết quả cho 2. Giá trị này là \bar{S}_b .

Trong trường hợp này, $\bar{S}_b = 0,04224/2 = 0,02112$

Tiếp đó, $s_{\bar{s}_n}^2 = \bar{S}_w$ và $s_{\bar{s}_{am}}^2 = (\bar{S}_b - \bar{S}_w)/2$

Trong trường hợp này, $s_{\bar{s}_n}^2 = 0,00691$ và $s_{\bar{s}_{am}}^2 = (0,02112 - 0,00691)/2 = 0,007104$

Giá trị của F_1 và F_2 phụ thuộc vào số phần mẫu được kiểm tra trong phép thử này. Khi phân tích 10 phần mẫu thì $F_1 = 1,88$ và $F_2 = 1,01$ (giá trị cho số phần mẫu khác có thể tham khảo thêm trong Tài liệu tham khảo [11]).

Nếu độ lệch chuẩn mục tiêu được áp dụng cho các kết quả của phép thử thành thạo này, σ_p , bằng $0,25 \log_{10}$ đơn vị, thì

$$F_1(0,3\sigma_p)^2 + F_2s_{\bar{s}_n}^2 = 1,88 \times (0,3 \times 0,25)^2 + 1,01 \times 0,00691 = 0,01755$$

Giá trị này lớn hơn $s_{\bar{s}_{am}}^2$ (0,007104). Do đó, Điều kiện (B.5) được thỏa mãn và vật liệu thử này đủ độ đồng nhất.

Phụ lục C
(Tham khảo)

**Phương pháp thực hành đánh giá dài hạn kỹ năng của các đơn vị
tham gia chương trình PT sử dụng các phương pháp định lượng**

C.1 Chuẩn bị dữ liệu phân tích

Bốn cột trong một bảng trình bày được dùng để phân tích các kết quả định lượng:

- a) số đếm được báo cáo bởi đơn vị tham gia (số đếm n_R);
- b) số đếm được sử dụng vẽ đồ thị và biểu đồ, và/hoặc để tính điểm (số đếm n_S);
- c) số đếm để phân tích (số đếm n_A);
- d) một cột để nhận xét (nội dung được điền) (số đếm n_C) để ghi lại bất kỳ lưu ý nào về kết quả của các đơn vị tham gia.

Số đếm n_R thông thường được điền vào ở dạng số học (ví dụ: 1100) hoặc số khoa học (ví dụ, 1,1e3). Nếu một kết quả được báo cáo ở dạng một giá trị bị chặn, thì sẽ sử dụng một nội dung nhận xét và một kí hiệu "lớn hơn" hoặc "nhỏ hơn" sẽ được điền vào trước chữ số (ví dụ: < 10, > 1100, v.v...).

Số đếm n_R cũng có thể được điền với nội dung khác, như NE (không thử/không kiểm tra), ND (không phát hiện) và UA (không thể đánh giá). Cần thực hiện nhập giá trị cho tất cả các trường trong cột.

Nếu số đếm n_R không thể phân tích được, (ví dụ: điền vào là NE) thì sẽ không phân tích sâu hơn hoặc không tính điểm.

Nếu số đếm n_R không thể đưa vào phân tích thống kê, ví dụ: kết quả được báo cáo ở dạng một giá trị bị chặn, nhưng vẫn được tính một điểm số, và/hoặc kết quả này được gắn lên đồ thị, sau đó sẽ ấn định một giá trị số học cho số đếm n_S này.

Giá trị này sẽ đảm bảo rằng điểm số chính xác được tính và kết quả này được vẽ chính xác lên đồ thị. Ví dụ: điểm số có thể không được tính cho các kết quả báo cáo là "không phát hiện" nhưng có thể hữu ích khi đưa các kết quả này lên một biểu đồ. Trong trường hợp này, số đếm n_S có thể được điền vào như là -99 và cột số đếm n_A cần để trống.

Nếu một kết quả báo cáo được tính điểm, một điểm số sẽ được đưa vào tính toán thống kê; khi đó số đếm $n_A =$ số đếm n_S .

C.2 Xử lý các số liệu bị giới hạn

Tất cả các kết quả bị chặn dưới được phân tích theo một trong các cách sau:

- a) Tất cả các kết quả này được ấn định một giá trị số đếm n_A là 0,2, nhưng không được đưa vào phân tích (số đếm $n_A = 0$). Điều này phát sinh khi việc báo cáo một giá trị bị chặn dưới, hoặc báo cáo là "zero" (0), hoặc "không phát hiện" rõ ràng là do lỗi của phòng thử nghiệm vì mức vi sinh vật hoặc nhóm vi sinh đích có trong mẫu là tương đối khá cao.
- b) Tất cả các giá trị bị chặn dưới và các kết quả bằng 0 hoặc "không phát hiện" sẽ được ấn định một số đếm n_S là 0,2¹⁾ và được đưa vào phân tích vì mật độ vi sinh vật hoặc nhóm vi sinh vật đích là tương đối thấp và các kết quả này có thể phát sinh ngẫu nhiên (số đếm $n_S =$ số đếm $n_A = 0,2$). Có một số ngoại lệ, chẳng hạn khi giá trị bị chặn dưới được báo cáo (<x) cho thấy một mức phát hiện không thích hợp và giá trị của x thực tế cao hơn trung vị (trong tính toán ban đầu). Trong các trường hợp ngoại lệ này thì cột số đếm n_A cần để trống.
- c) Không tính điểm cho các giá trị bị chặn dưới. Nhìn chung, nên cho điểm, trừ khi có một lý do về mặt vi sinh học để không làm điều đó. Trong tình huống này, trường số đếm n_A và số đếm n_S để trống.

Các giá trị bị chặn trên được điền vào là $1,0 \log_{10}$, trên số điểm tối đa được báo cáo. Nếu vi bất cứ lý do gì, kết quả này bị loại ra khỏi các biểu đồ và phân tích, và không được tính điểm nào, thì trường số đếm n_S và số đếm n_A nên để trống. Nếu một kết quả được báo cáo là >x, trong đó giá trị của x thấp hơn giá trị trung vị thì trường số đếm n_A nên để trống.

C.3 Dựng biểu đồ của các kết quả

Biểu đồ được xây dựng dựa trên các giá trị số đếm n_S . Có hai dạng biểu đồ được sử dụng cho các kết quả của chương trình PT: biểu đồ tần suất (hoặc biểu đồ cột) và biểu đồ phân tán. Các điểm sẽ được xem xét khi lựa chọn kiểu biểu đồ để sử dụng, kể cả kiểu định lượng (MPN hoặc đếm khuẩn lạc...) và số đơn vị tham gia áp dụng cách định lượng này

Biểu đồ cột được tạo ra từ giá trị log thập phân của số đếm n_R , được nhóm lại như sau:

< 0, (0 đến 0,05), (0,05 đến 0,1), (0,1 đến 0,15), [giá trị \log_{10} (số đếm n_R) lớn nhất], [giá trị \log_{10} (số đếm n_R) lớn nhất + 0,05].

Mọi trường hợp đặc biệt hoặc không số hóa được đưa lên biểu đồ (ví dụ: - 99) cần đưa chúng vào một thang riêng.

Cách khác, có thể tạo dựng biểu đồ cột dựa trên giá trị logarit thập phân của số đếm n_R được làm tròn đến 0,05 gần nhất. Trong trường hợp này, tạo nhóm giá trị như sau:

0, 0,05, 0,1, 0,15, ... giá trị \log_{10} (số đếm n_R) lớn nhất.

TCVN 9331:2012

Trong trường hợp này, thang 0,1 bao gồm mọi kết quả từ 0,075 đến 0,124.

Biểu đồ phân tán có thể được dựng bằng cách sử dụng trực tiếp giá trị số đếm n_s , sau đó hoán đổi trục y thành một thang log thập phân. Các số liệu không được số hóa sẽ được loại ra khỏi biểu đồ phân tán.

Cách nhóm theo $0,05 \log_{10}$ thường được sử dụng cho biểu đồ cột, do đó dãy tính điểm cũng được làm tròn đến $0,05 \log_{10}$.

C.4 Tính điểm

Khi các kết quả của chương trình PT được đánh giá bằng điểm số, thì các chuẩn mực tính điểm cần được liệt kê trong kế hoạch chương trình PT hoặc trong các báo cáo. Điểm số tính cho các kết quả định lượng được điền vào một trường (cột) điểm (n_c -score); điều này có thể bổ sung thủ công, khi cần.

Lưu ý rằng điểm số cuối cùng đối với một kết quả có thể đạt được từ n_c -score, nhưng các yếu tố khác có thể cũng cần được xem xét đến.

Phụ lục D
(Tham khảo)

Ví dụ về một bảng dữ liệu an toàn

Bảng dữ liệu an toàn đối với các mẫu của chương trình PT thực phẩm – dạng đông khô

Ngày có hiệu lực:	ngày-tháng-năm
Ngày soát xét:	ngày-tháng-năm
Ban hành đến:	tất cả các đơn vị tham gia chương trình

Nhận dạng sản phẩm và nơi thiết lập

Sản phẩm:	Các mẫu thực phẩm được tạo ra cho các phép thử vi sinh thông thường
Nơi thiết lập:	Địa chỉ đầy đủ và các chi tiết liên hệ với nhà tổ chức chương trình

Cấu tạo hoặc thông tin về thành phần

Các lọ thủy tinh nhỏ (vial) với nguyên liệu được làm đông khô, có chứa một hỗn hợp vi khuẩn thuộc nguy cơ nhóm 2 theo quy định bởi luật quốc gia và quốc tế. Vi sinh vật thuộc nhóm nguy cơ 2 có thể gây bệnh cho người và có thể là mối nguy cho cán bộ phòng thử nghiệm, nhưng không chắc phát tán ra cộng đồng.

Nhận dạng mối nguy

Mối nguy hóa lý:	Không áp dụng
Mối nguy cơ sức khỏe:	Nguy cơ lây nhiễm thấp, miễn là chú ý thao tác tốt trong phòng thử nghiệm.
Mối nguy về môi trường:	Không áp dụng

Các phương tiện sơ cứu

Nếu xảy ra tai nạn khi tiếp xúc với vật liệu thử thì nhân viên phòng thử nghiệm phải tuân thủ quy trình sơ cứu nội bộ như vẫn thường được áp dụng khi phơi nhiễm với một mẫu thực phẩm tương tự (có chứa mối nguy vi sinh). Tiếp theo, cần có chỉ dẫn của thầy thuốc đối với sự phơi nhiễm này.

Các phương tiện chống cháy

Không áp dụng

TCVN 9331:2012

Các phương tiện làm giảm bớt tai nạn

Phủ lên khu vực thao tác bằng một vật liệu hút-thấm và tưới đẫm lên nó một chất sát trùng thích hợp. Khu vực này cần để yên trong 30 min trước khi lau dọn lớp dung dịch sát trùng trên bằng một lớp vật liệu hút-thấm nữa. Cần mang trang bị bảo vệ cá nhân thích hợp.

Quản lý và lưu giữ

Bảo quản ở nhiệt độ phòng, trong chỗ tối. Các mẫu cần được xử lý trong môi trường phòng thử nghiệm, như trong hướng dẫn hoặc quy chuẩn quốc gia, thích hợp với phân tích vi sinh. Cán bộ thao tác với vật liệu thử cần được đào tạo về cách thao tác với các mẫu sinh vật lây nhiễm. Vật liệu này cần được xử lý với mức thận trọng giống như khi làm việc với các vóir mẫu thực phẩm tương tự. Cần tránh tiếp xúc tay và miệng trong quá trình thao tác với mẫu thử và quy trình chuẩn về rửa tay liên quan đến thao tác với các mẫu thường ngay cũng cần áp dụng với các mẫu PT.

Kiểm soát phơi nhiễm và bảo hộ cá nhân

Sử dụng GLP và mặc đồ bảo hộ phòng thử nghiệm thích hợp, mang găng tay và kính bảo vệ mắt. Việc lấy các lọ mẫu ra khỏi bao bì và hoàn nguyên cần được thực hiện trong một tủ hút bảo vệ.

Đặc tính hóa học và vật lý

Vật liệu khô, trơ, không mùi.

Độ ổn định và tính phản ứng

Quá trình bảo quản dường như không làm tăng hoặc giảm nguy cơ lây nhiễm gắn với việc xử lý mẫu.

Thông tin về độc tính

Không áp dụng

Thông tin về sinh thái

Không áp dụng

Xem xét loại bỏ

Các vật liệu đã sử dụng cần phải khử nhiễm bằng nồi hấp tiệt trùng, giống như đối với các thực phẩm có chứa các vi sinh vật lây nhiễm và phù hợp với các quy định quốc gia và nội bộ.

Thông tin vận chuyển

Tham khảo các quy định quốc gia và quốc tế về vận chuyển vi khuẩn thuộc nhóm nguy hiểm cấp độ 2 (chất sinh học, cấp hạng B, UN3373).

Thông tin quy định

EC Tác nhân sinh học, cấp độ nguy hiểm/nhóm nguy cơ 2

CẢNH BÁO – Bảng dữ liệu an toàn này không hàm chứa các đánh giá mối nguy về không gian thao tác riêng của người sử dụng theo yêu cầu của luật an toàn và sức khỏe.

Thông tin khác

Khi xảy ra sự cố liên quan đến nhân viên thử nghiệm bị phơi nhiễm với vật liệu chứa trong mẫu, cần liên hệ với nhà tổ chức chương trình PT.

Để có thêm thông tin an toàn liên quan đến mẫu, các bên tham gia nên đọc kỹ bản hướng dẫn gửi kèm theo mẫu này.

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 tiêu chuẩn.*
- [2] TCVN 6910-4 (ISO 5725-4) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 4: Các phương pháp cơ bản xác định độ đúng của phương pháp đo tiêu chuẩn.*
- [3] TCVN 8128-1:2009 (ISO/TS 11133-1:2009) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và sản xuất môi trường nuôi cấy – Phần 1: Hướng dẫn chung về đảm bảo chất lượng đối với việc chuẩn bị môi trường nuôi cấy trong phòng thử nghiệm*
- [4] ISO 16140 *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods*
- [5] TCVN ISO/IEC 17025 *Yêu cầu chung về năng lực của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn*
- [6] ISO/TS 19036 *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations*
- [7] ISO/IEC Guide 99 *International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM)*
- [8] ILAC-G13, *ILAC Guidelines for the requirements for the competence of providers of proficiency schemes.* Available (2010-02-10) at: http://www.ilac.org/documents/ILAC_G13_08_2007.pdf
- [9] Thompson, M., ELLISON, L.R., WOOR, R. for IUPAC. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. *Pure Appl. Chem.*, 2006, **78**, pp. 145-196. Available (2010-10-08) at: <http://iupac.org/publications/pac/2006/pdf/7801x0145.pdf>
- [10] AUGUSTIN, J.C., CARLIER, V. Lessons from the organization of a proficiency testing program in food microbiology by interlaboratory comparison: analytical methods in use, impact of methods on bacterial counts and measurement uncertainty of bacterial counts. *Food Microbiol.* 2006, **23**, pp. 1-138
- [11] FEARN, T., THOMPSON, M. A new test for "sufficient homogeneity". *Analyst* 2001, **126**, pp. 1414-1417
- [12] HEISTERKAMP, S.H., HOEKSTRA, J.A., VAN STRIJP-LOCKEFEEER, N.G.W.M., VAVELAAR, A.H., MOOIJMAN, K.A, IN'T VELD, P.H., S.H.W., MAIER, E.A.; GRIEPINK, B. *Statistical analysis of certification trials for microbiological reference materials.* Luxembourg: commission of the European communities, 1993. 41 p. (Report EUR 15008 EN.)

- [13] JARVIS, B. Sampling for microbiological analysis. In: LUND, B.M., BAIR-PACKER, A.C., GOULD, G.W., editors. *The microbiological safety and quality of food*, Vol. 2, pp.1691-1734. Gaithersburg, MD: Aspen, 2000
- [14] JARVIS, B. *Statistical aspects of the microbiological examination of foods*, 2nd edition. Amsterdam: Academic Press, 2008. 306 p.
- [15] JARVIS, B., HEDDGES,A.J., CORRY, J.E.L. Assessment of measurement uncertainty for quantitative methods of analysis: comparative assessment of the precision (uncertainty) of bacterial colony counts. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, **116**, pp. 44-51
- [16] JARVIS,B., CORRY, J.E.R., HEDGES, A.J. Estimates of measurement uncertainty from proficiency testing schemes, internal laboratory quality monitoring and during routine enforcement examination fo foods. *J. Appl. Microbiol.* 2007, **103**, pp. 462-467
- [17] TILLET, H.E., LIGHTFOOT, N.F. EATON, S. PLACE, B.M. External quality assessment of microbial counts from water: To score or not to score for proficiency. *J. Chart. Inst. Water Environ. Manage.* 2000, **14**, pp. 304-308
-