



VIỆN KIỂM NGHIỆM AN TOÀN VỆ SINH THỰC PHẨM QUỐC GIA
NATIONAL INSTITUTE FOR FOOD CONTROL

NÂNG CAO CHẤT LƯỢNG KẾT QUẢ KIỂM NGHIỆM MẪU TNTT VI SINH

ThS. Nguyễn Thành Trung
Khoa Vi sinh và Biến đổi gen

Hà Nội, Tháng 4 năm 2023

I

Thử nghiệm thành thạo

II

Đảm bảo chất lượng kiểm nghiệm TNTT

III

Nguyên nhân và hướng khắc phục

IV

Xây dựng biểu đồ xu hướng: Control chart

Thực phẩm: định lượng, định tính

Thực phẩm chức năng, TPBVSK, TP DDCT: ĐL, ĐT

Nước uống đóng chai: Định lượng

Thức ăn chăn nuôi: Định lượng, Định tính

CHƯƠNG TRÌNH TNTT

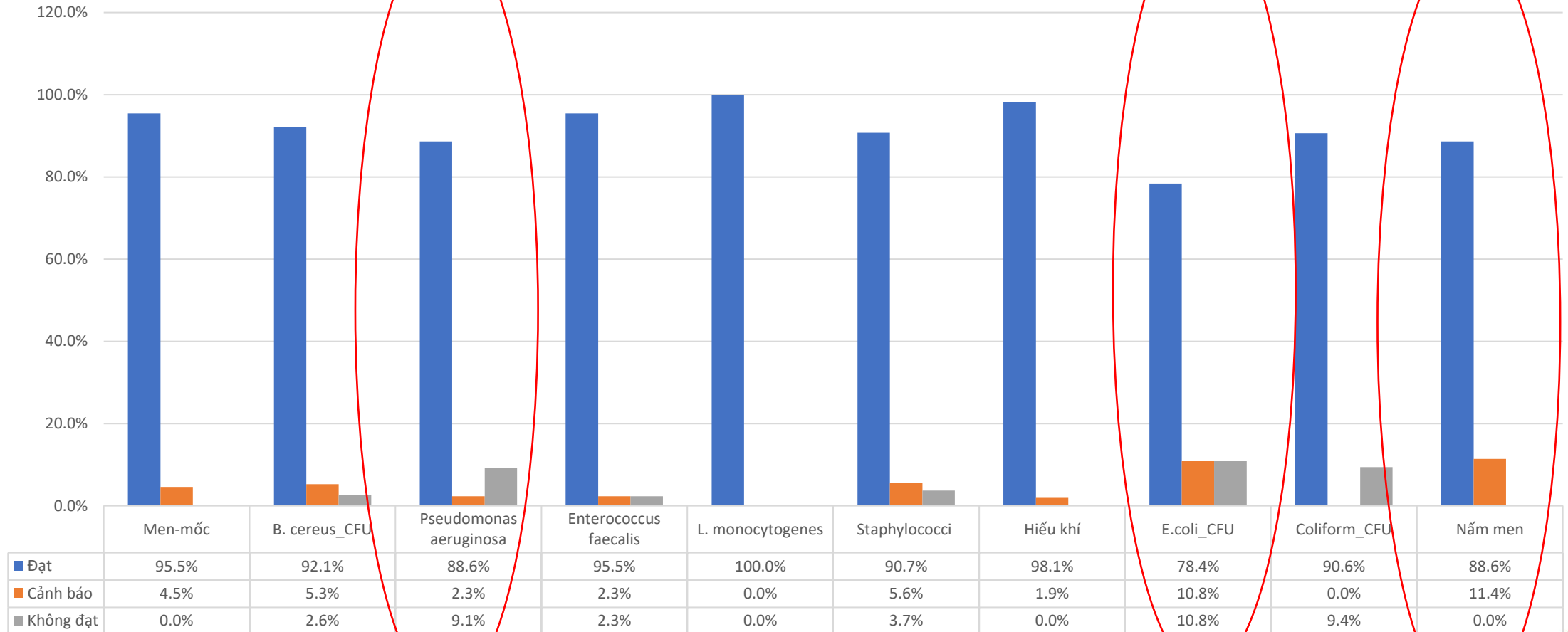


Stt	Tên chương trình TNTT
1	V22.21: Tổng số vi sinh vật hiếu khí trong thực phẩm
2	V22.22: Tổng số nấm men, nấm mốc trong thực phẩm
3	V22.28: Staphylococci dương tính coagulase trong thực phẩm bổ sung
4	V22.29: Escherichia coli, Salmonella trong thịt
5	V22.35: Bacillus cereus trong thực phẩm
6	V22.36: Tổng số nấm men, nấm mốc trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe
7	V22.44: Listeria monocytogenes trong thực phẩm
8	V22.45: Staphylococci dương tính coagulase trong thực phẩm
9	V22.46: Tổng số vi sinh vật hiếu khí trong thực phẩm
10	V22.47: Coliforms, Escherichia coli trong thực phẩm
11	V22.48: Tổng số nấm men trong thực phẩm
12	V22.53: Tổng số vi sinh vật hiếu khí, Coliforms trong thực phẩm bổ sung
13	NUỚC: 03 chương trình
14	V22.14: Escherichia coli, Coliforms trong nước
15	V22.30, V22.37: Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis trong nước

TỔNG HỢP TNTT 2022



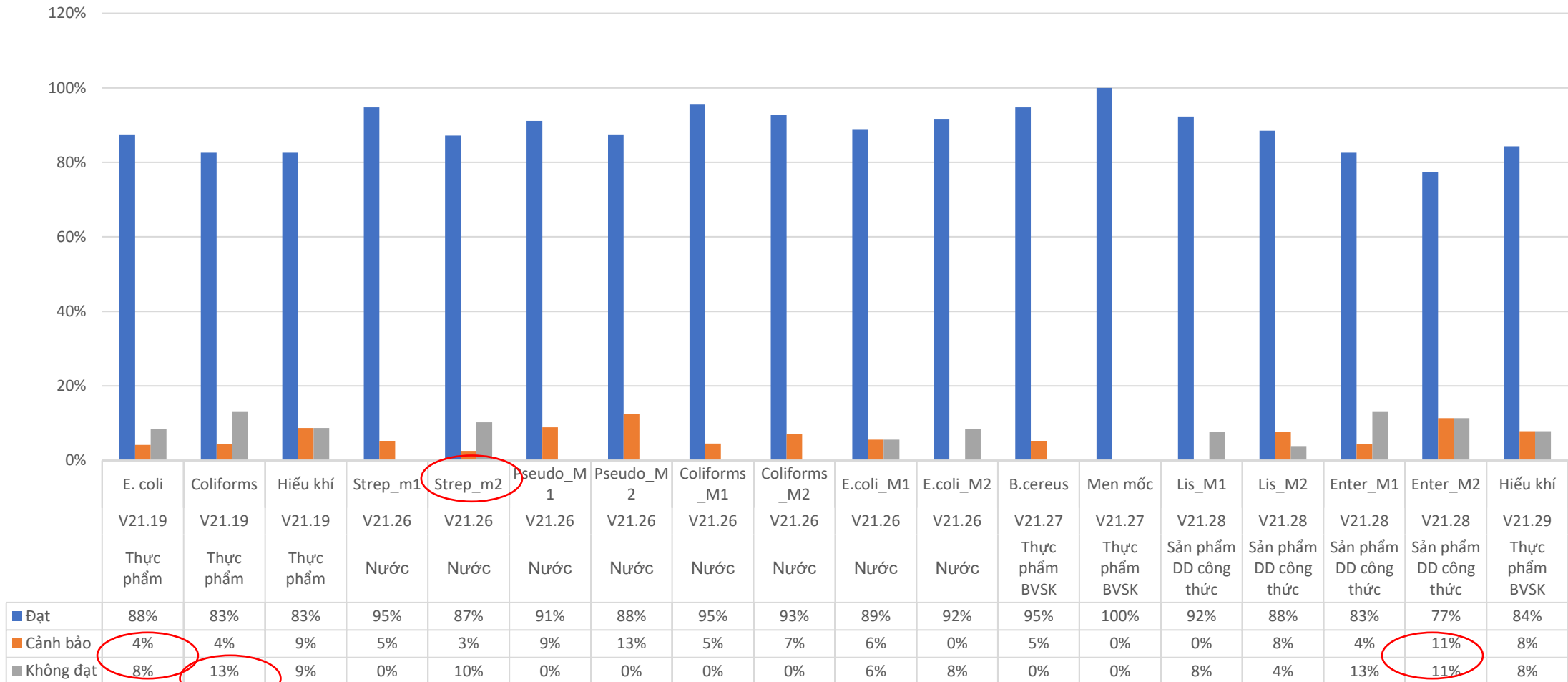
TNTT NĂM 2022



TỔNG HỢP TNTT 2021



TNTT NĂM 2021



Chỉ tiêu thường bị số lạc



Nhóm chỉ tiêu định lượng: *S. aureus*, NM-NM, kị khí

Nhóm chỉ tiêu định tính: *Salmonella*, *Listeria*

Nhóm chỉ tiêu trong nước: *P. aeruginosa*, Coliform

I

Thử nghiệm thành thạo 2021 và 2022

II

Đảm bảo chất lượng TNTT

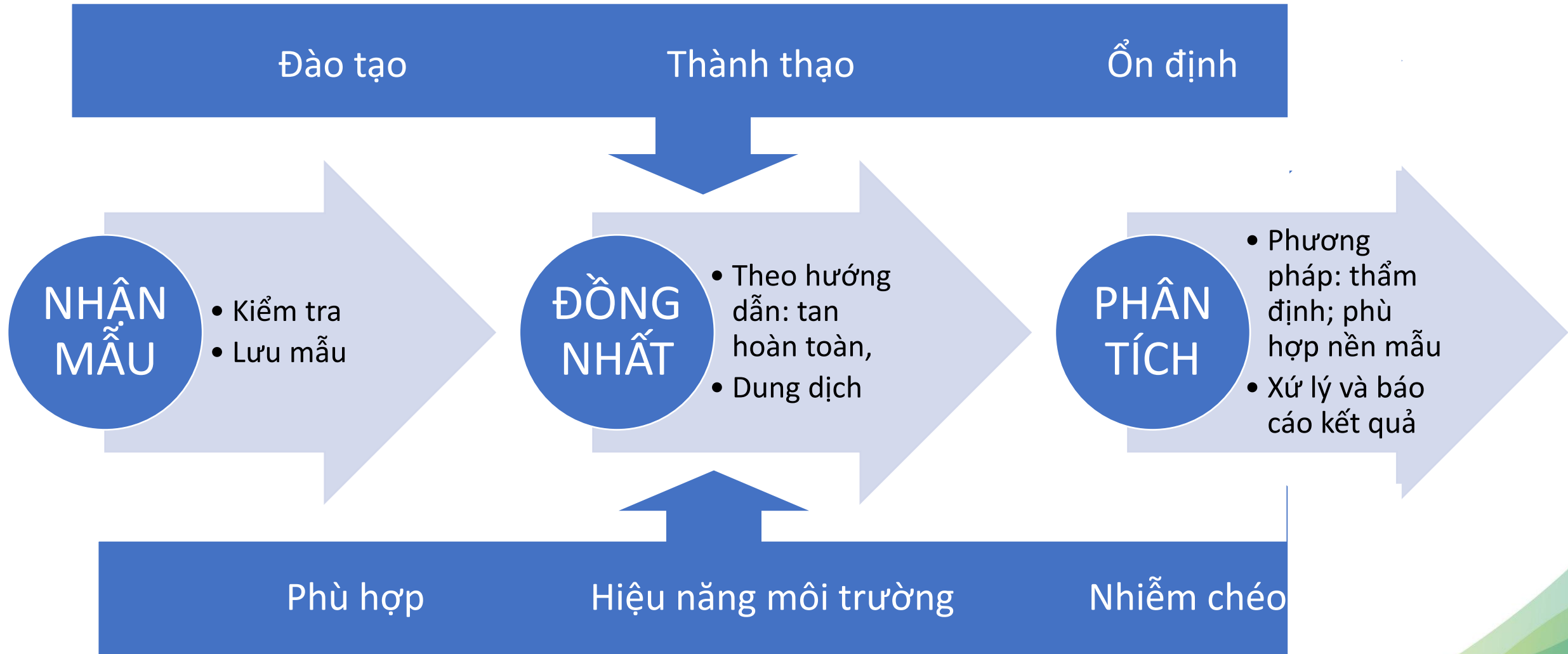
III

Nguyên nhân và hướng khắc phục

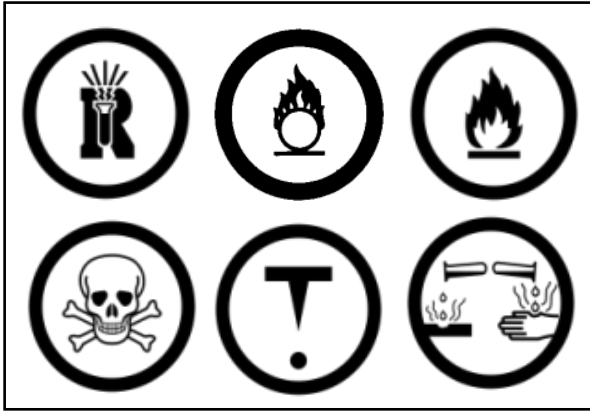
IV

Xây dựng biểu đồ xu hướng: Control chart

QUÁ TRÌNH THỰC HIỆN TNTT



Biểu tượng an toàn hóa chất - Vi sinh nhiễm



WHMIS (Canada)



European Union



ADG Code



ĐẢM BẢO KẾT QUẢ TNTT



- Thực hiện đúng quy trình đã được thẩm định
- Môi trường hóa chất cần được kiểm soát theo ISO 11133: độ thu hồi, độ chọn lọc, độ đặc hiệu
- Các thể tích cần được đong chính xác: $\leq 2\%$
- Tiến hành các thao tác tuân thủ theo TCVN 6404 hoặc ISO 8199: thao tác đổ trải, đổ trộn, ria, đọc kết quả hóa sinh
- Tuân thủ nghiêm ngặt về thời gian phân tích giữa các giai đoạn
- Đối chứng âm, dương, mẫu chứng trong quá trình phân tích, thử nghiệm hóa sinh

ĐẢM BẢO KẾT QUẢ TNTT



- Trang thiết bị phải được kiểm soát hoạt động theo đúng yêu cầu của phương pháp
- Nên có phân tích độ chệch của phương pháp áp dụng tại PTN, nếu có thể: tiến hành phân tích mẫu chuẩn hoặc tham gia các chương trình thử nghiệm thành thạo
- Có các chương trình đảm bảo chất lượng của PTN cho từng chỉ tiêu
- Đánh giá tay nghề - độ thành thạo của nhân viên thường xuyên/định kỳ

I

Thử nghiệm thành thạo 2021 và 2022

II

Đảm bảo chất lượng kiểm nghiệm TNTT

III

Nguyên nhân và hướng khắc phục

IV

Xây dựng biểu đồ xu hướng: Control chart

MỘT SỐ CHỈ TIÊU THƯỜNG SAI TRONG TNTT



STT	CHỈ TIÊU	LỖI SAI
1	<i>Salmonella</i> spp.	Âm tính giả/Dương tính giả
2	Hiếu khí	Số lượng thấp/cao
3	<i>S. aureus; Enterobactereace</i>	Âm tính giả Số lượng quá cao/quá thấp
4	Nấm men – nấm mốc	Số lượng thấp/cao Dương tính giả
5	<i>Listeria</i>	Âm tính giả
6	<i>E. coli</i> /Coliform trong nước	Dương tính giả
7	<i>P. aeruginosa, S. feacalis</i> trong nước	Số lượng quá cao Số lượng quá thấp

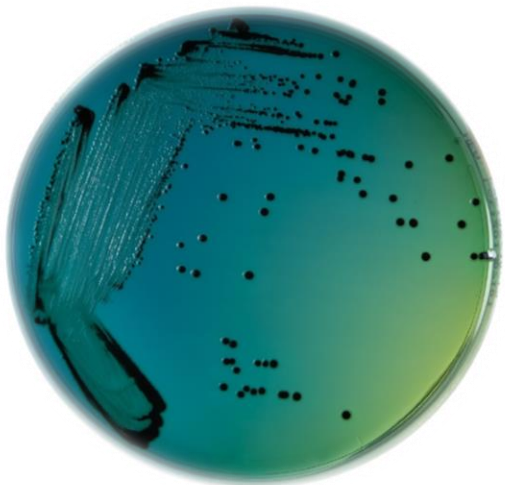
Nguyên nhân và hướng khắc phục



Chỉ tiêu <i>Salmonella</i> spp.	Nguyên nhân	Khắc phục
<ul style="list-style-type: none">➤ Âm tính giả➤ Dương tính giả	<ul style="list-style-type: none">➤ Nhầm khuẩn lạc: <i>Proteus</i>➤ Thiếu kháng huyết thanh/không phù hợp➤ Sai hóa sinh: màu đen phủ kín, phản ứng nhầm➤ Thiếu vật tư/hóa chất	<ul style="list-style-type: none">➤ Thực hiện đầy đủ bước➤ Kháng huyết thanh : BD, SSI; Biorap...➤ KT kháng huyết thanh: đặc hiệu, chọn lọc➤ Đọc kết quả hóa sinh: đủ thời gian➤ Kiểm soát mt theo ISO 11133



Môi trường thạch XLD



Môi trường thạch HE

Khuẩn lạc *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 trên đĩa thạch chọn lọc XLD và HE

Âm tính Dương tính



Môi trường TSI

Âm tính Dương tính



Môi trường Ure

Âm tính Dương tính



Môi trường LDC

Thử nghiệm các đặc tính sinh hoá của vi khuẩn *Salmonella*

Nguyên nhân và hướng khắc phục



Chỉ tiêu hiếu khí

Số lượng thấp
Số lượng cao

Nguyên nhân

- Thể tích đồng nhất chưa đúng: 100mL hoặc 9mL hoặc hút không chuẩn 1,0mL
- Đọc kết quả: đếm thiếu khuẩn lạc
- Thạch PCA: chưa được kiểm soát hiệu năng

Khắc phục

- Chuẩn bị chuẩn thể tích: 100mL; 9,0mL; 1,0mL
- Đếm 100% khuẩn lạc: nấm men, nấm mốc, vi khuẩn,...
- Đọc kết quả đúng giờ: 72h



Hình ảnh vi sinh vật hiếu khí trên môi trường thạch PCA

S. aureus

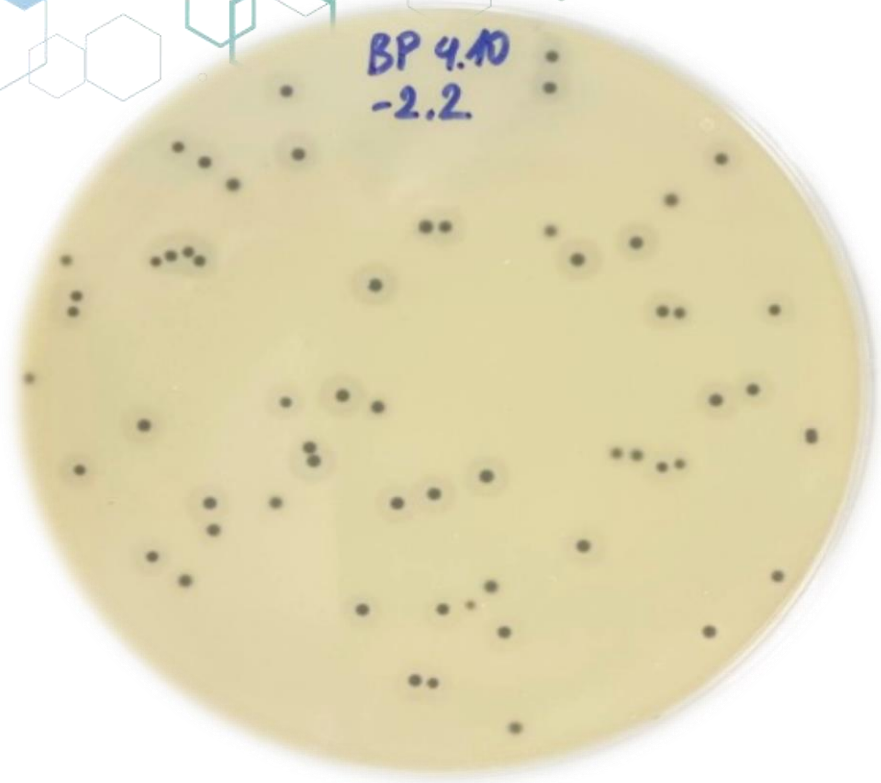
- Âm tính giả
- Số lượng quá cao
- Số lượng quá thấp

Nguyên nhân

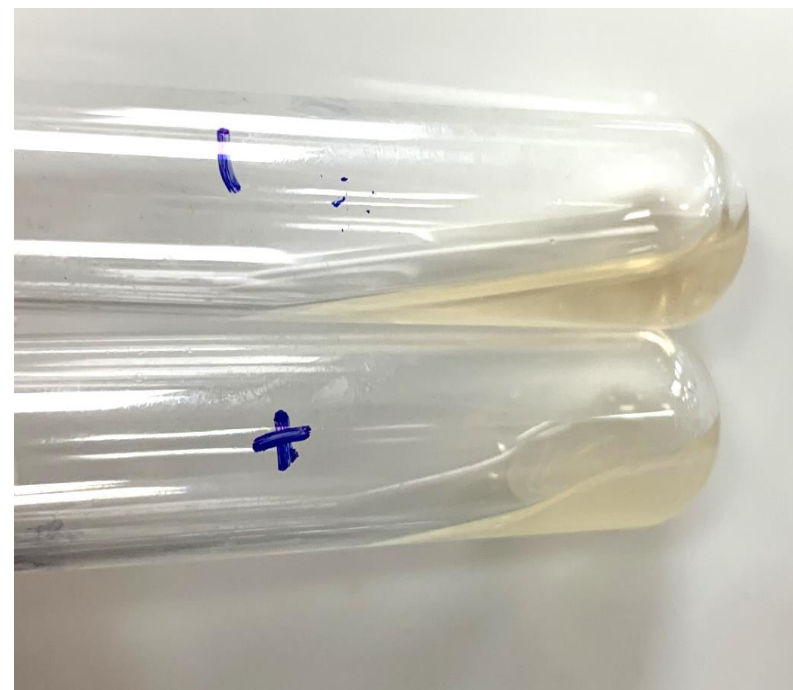
- Nhận biết sai khuẩn lạc
- Chưa kiểm soát chất lượng môi trường BP theo ISO 11133
- Chưa chuẩn thể tích
- Mất mẫu/tụ mẫu: lên thành, bị tụ
- Coagulase test: không chuẩn

Khắc phục

- Thử 100 % khuẩn lạc đen
- Kiểm soát môi trường BP với P_R theo ISO 11133
- Đong chuẩn thể tích
- Cấy từng đĩa, không chạm thành đĩa



Khuẩn lạc *Staphylococcus aureus*
ATCC 25923 trên môi trường thạch BP



Hình ảnh phản ứng coagulase dương tính của
chủng *S. aureus*

Nguyên nhân và hướng khắc phục



Nấm men - nấm mốc	Nguyên nhân	Khắc phục
<ul style="list-style-type: none">-Số lượng thấp-Số lượng cao- Dương tính giả	<ul style="list-style-type: none">- Thể tích đồng nhất chưa đúng: 100mL hoặc 9mL hoặc hút không chuẩn 1,0mL- Không thực hiện soi tươi: nhầm lẫn tb vi khuẩn là nấm- Thạch DG18 và DRBC: chưa được kiểm soát hiệu năng- Đọc kết quả giữa chu kỳ: rung đĩa- Nhiễm chéo do quá trình làm	<ul style="list-style-type: none">- Chuẩn bị chuẩn thể tích: 100mL; 9,0mL; 1,0mL- Soi khuẩn lạc mọc trên đĩa: ít nhất 5 kl/loại- Đọc kết quả: tại 5 ngày và 7 ngày- Kiểm soát hiệu năng môi trường: P_R- Kiểm soát nhiễm chéo: đặt đĩa kiểm soát đk môi trường, tiệt trùng các vật dụng, vt...



Hình ảnh nấm mốc trên môi trường DG18



Hình ảnh nấm men trên môi trường DG18

Chỉ tiêu *Listeria*

- Âm tính giả
- Dương tính giả
- Số lượng quá cao/thấp

Nguyên nhân

- Nhầm khuẩn lạc: không chuẩn khuẩn lạc điển hình
- Không tuân thủ đúng giờ
- Sai hóa sinh: không đủ hóa sinh
- Thiếu vật tư/hóa chất
- Phép thử CAMP test không chuẩn

Khắc phục

- Thực hiện đầy đủ bước: chuyển lên thạch dinh dưỡng
- Tuân thủ đúng giờ
- Đọc kết quả hóa sinh đúng giờ
- Kiểm soát theo ISO 11133
- CAMP test: đủ chủng, thạch máu cừu, đọc đúng giờ, ria chuẩn (không chạm vào nhau)

Nguyên nhân và hướng khắc phục



E. coli/Coliform trong nước

- Âm tính giả
- Dương tính giả
- Số lượng quá cao/thấp

Nguyên nhân

- Nhầm khuẩn lạc: không chuẩn KL điển hình
- Nhận biết màu: nhầm màu, không tách biệt khuẩn lạc
- Thể tích: không chuẩn 250/100mL
- Thiếu vật tư/hóa chất: chất bổ sung
- Bị nhiễm chéo: không khử trùng thiết bị lọc
- Nhầm với *S. feacalis*

Khắc phục

- Đọc kq: kinh nghiệm nhận biết KL trên CCA, TTC
- Tuân thủ thời gian
- Hiệu chỉnh thể tích: 250mL/100mL
- Kiểm soát theo ISO 11133: giá trị P_R
- Tiệt trùng trang thiết bị, vật tư liên quan
- Hình thái KL theo thời gian, thử hóa sinh nếu nghi ngờ

Nguyên nhân và hướng khắc phục



P. aeruginosa
trong nước

Âm tính giả

Dương tính giả

Số lượng quá
cao/thấp

Nguyên nhân

Nhầm khuẩn lạc: thử
thiếu các loại khuẩn lạc

Không nuôi đủ 48h

Sai hóa sinh: Không thử
đủ tính chất sinh hóa

Đọc nhầm kq phép thử
sinh hóa

Không đúng thể tích

Khắc phục

Thực hiện thử 03 loại khuẩn lạc:
trắng phát quang, hồng-nâu,
xanh

Tuân thủ đúng giờ: đọc kết quả
tại 24h và 48h

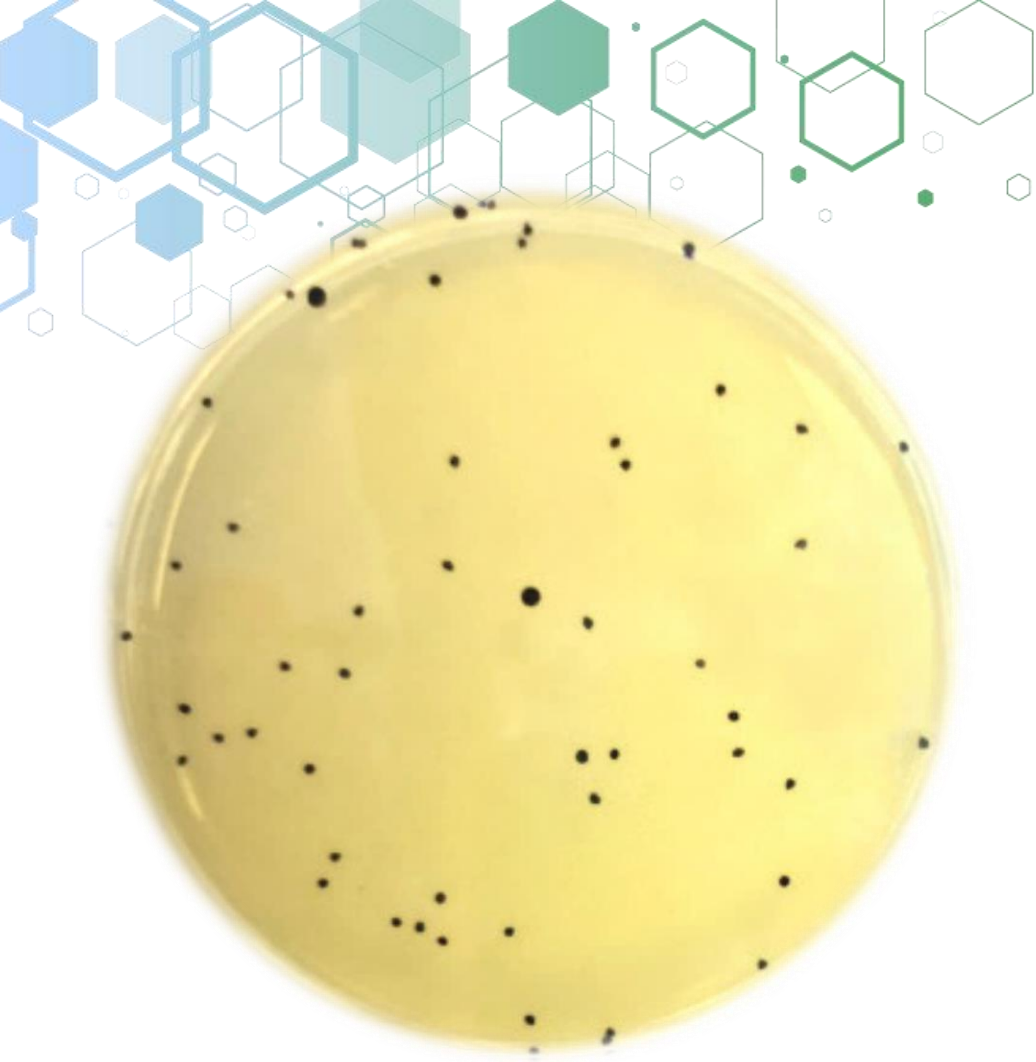
Đọc kết quả hóa sinh đúng giờ

Kiểm soát theo ISO 11133

Lọc đúng thể tích, hiệu chỉnh
dụng cụ đong hoặc thiết bị

Nguyên nhân và hướng khắc phục

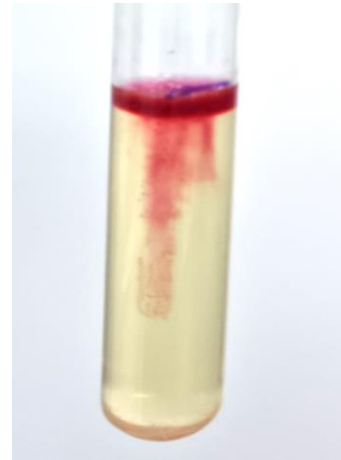
<i>Clostridium perfringens</i>	Nguyên nhân	Khắc phục
<ul style="list-style-type: none">- Âm tính giả- Dương tính giả- Số lượng quá cao/thấp	<ul style="list-style-type: none">- Nhầm khuẩn lạc: thiếu kl đen- Thể tích: không chuẩn thể tích pha loãng 9,0mL- Thiếu vật tư/hóa chất: chất bổ sung- Điều kiện kỵ khí chưa đạt- Thử nghiệm hóa sinh: nhận biết nhầm tính di động, hóa lỏng gelatin	<ul style="list-style-type: none">- Không thử đủ kl- Tuân thủ thời gian: tránh mọc lan- Kiểm soát theo ISO 11133: giá trị P_R- Tiệt khuẩn trang thiết bị, vật tư liên quan- Hình thái KL theo thời gian, ria hai đường, thử thêm tính chất hóa sinh, nếu nghi ngờ



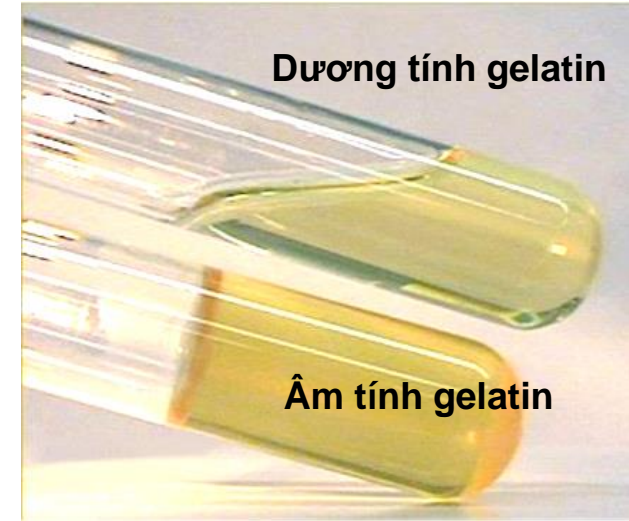
Khuẩn lạc *Clostridium perfringens* ATCC 13124 trên môi trường thạch TSC



Tính không di
độ nitrat



Khả năng khử
nitrat thành nitrit



Thử nghiệm khả năng
hoá lỏng gelatin

Thử nghiệm các đặc tính sinh hoá của vi khuẩn *C. perfringens*

I

Thử nghiệm thành thạo 2021 và 2022

II

Đảm bảo chất lượng kiểm nghiệm TNTT

III

Nguyên nhân và hướng khắc phục

IV

Xây dựng biểu đồ xu hướng: Control chart

BIỂU ĐỒ XU HƯỚNG



- Theo hướng dẫn của tiêu chuẩn NMKL Procedure No. 18
- Nguyên tắc:
 - ❖ Xây dựng biểu đồ xu hướng bao gồm các giá trị giới hạn trên và giới hạn dưới của phép đo, các giá trị giới hạn được tính toán dựa trên giá trị trung bình và độ lệch chuẩn theo kết quả logarit của từng phép phân tích

Biểu đồ xu hướng

Xử lý các giá trị sai lệch



- Quy định tại các phòng thử nghiệm:
 - ❖ Cách theo dõi các xu hướng
 - ❖ Cách xử lý kết quả sai lệch
 - ❖ Điều tra nguyên nhân
- Tài liệu kiểm soát:
 - ❖ Tài liệu chứng chuẩn/chất chuẩn
 - ❖ Nhật ký thiết bị, nhiệt độ
 - ❖ Hiệu năng môi trường
 - ❖ Kết quả và xu hướng của các thử nghiệm liên phòng, TNTT

Vẽ biểu đồ xu hướng



Phân tích mẫu tham chiếu: **RM,**
CRM

- Số lượng từ 10-20 mẫu

Vẽ biểu đồ

- trục x – ngày thực hiện
- trục y – giá trị phép đo

Tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (logarit)

- vẽ đường giá trị trung bình

Tính giới hạn cảnh báo và giới hạn kiểm soát

- vẽ đường giá trị giới hạn cảnh báo trên/dưới
- Vẽ đường giá trị giới hạn kiểm soát trên/dưới

Tiếp tục theo dõi mẫu theo thời gian

- điền giá trị phép đo vào biểu đồ xu hướng

Ví dụ 1



Bảng 1. Dữ liệu cần để xây dựng biểu đồ kiểm soát theo SLV (ví dụ: chỉ tiêu hiệu khí- **Mẫu CRM, RM**)

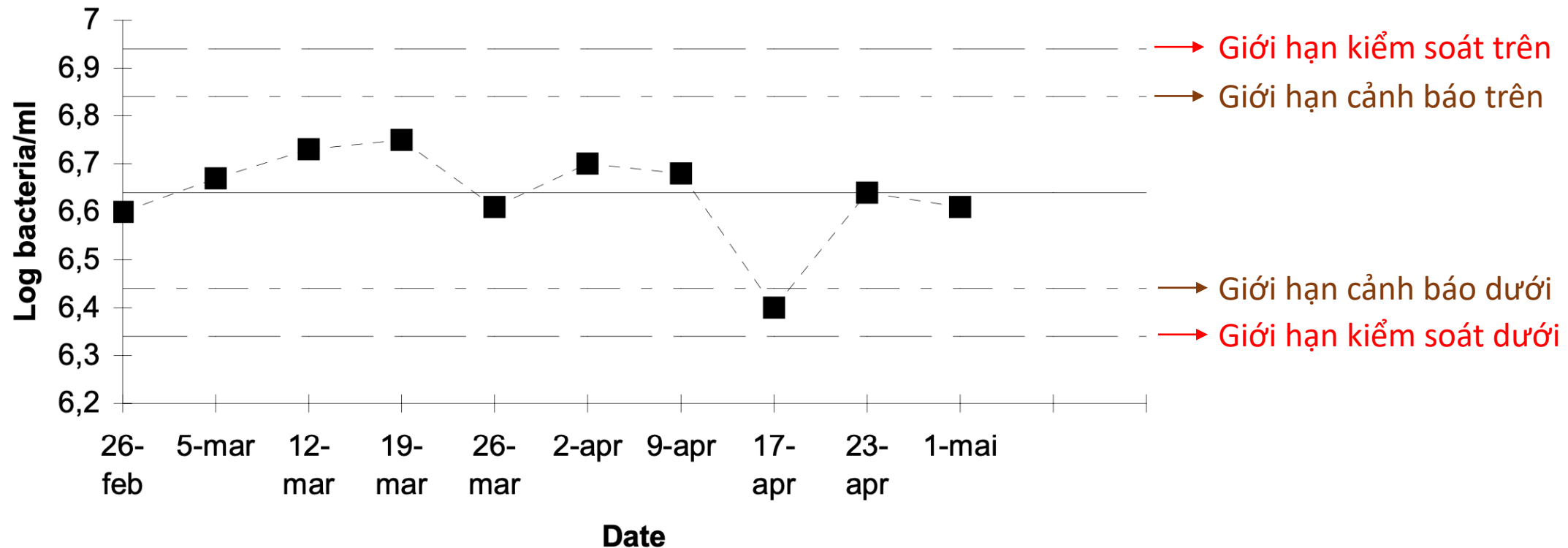
Mẫu	Ngày thực hiện	Log CFU/mL (x)	(x – mv)	(x – mv) ²
1	27/02	6,60	-0,04	0,0016
2	06/03	6,67	0,03	0,0009
3	13/03	6,73	0,09	0,0081
4	20/03	6,75	0,11	0,0121
5	27/03	6,61	-0,03	0,0009
6	03/04	6,70	0,06	0,0036
7	10/04	6,68	0,04	0,0016
8	18/04	6,40	-0,24	0,0576
9	24/04	6,64	0,00	0,0000
10	02/05	6,61	-0,03	0,0009
n = 10		$\Sigma x = 66,39$		$\Sigma(x - mv)^2 = 0,0873$

Ví dụ 1



- Giá trị trung bình: $mv = \frac{\sum x}{n} = \frac{66,39}{10} = 6,64$
- Độ lệch chuẩn: $s = \frac{\sqrt{\sum(x-mv)^2}}{n-1} = \frac{\sqrt{0,0873}}{10-1} = 0,10$
- Giới hạn cảnh báo: $mv \pm 2 \times s = 6,64 \pm 2 \times 0,1 = 6,64 \pm 0,2$
- Giới hạn kiểm soát: $mv \pm 3 \times s = 6,64 \pm 3 \times 0,1 = 6,64 \pm 0,3$

Biểu đồ kiểm soát sử dụng RM/CRM



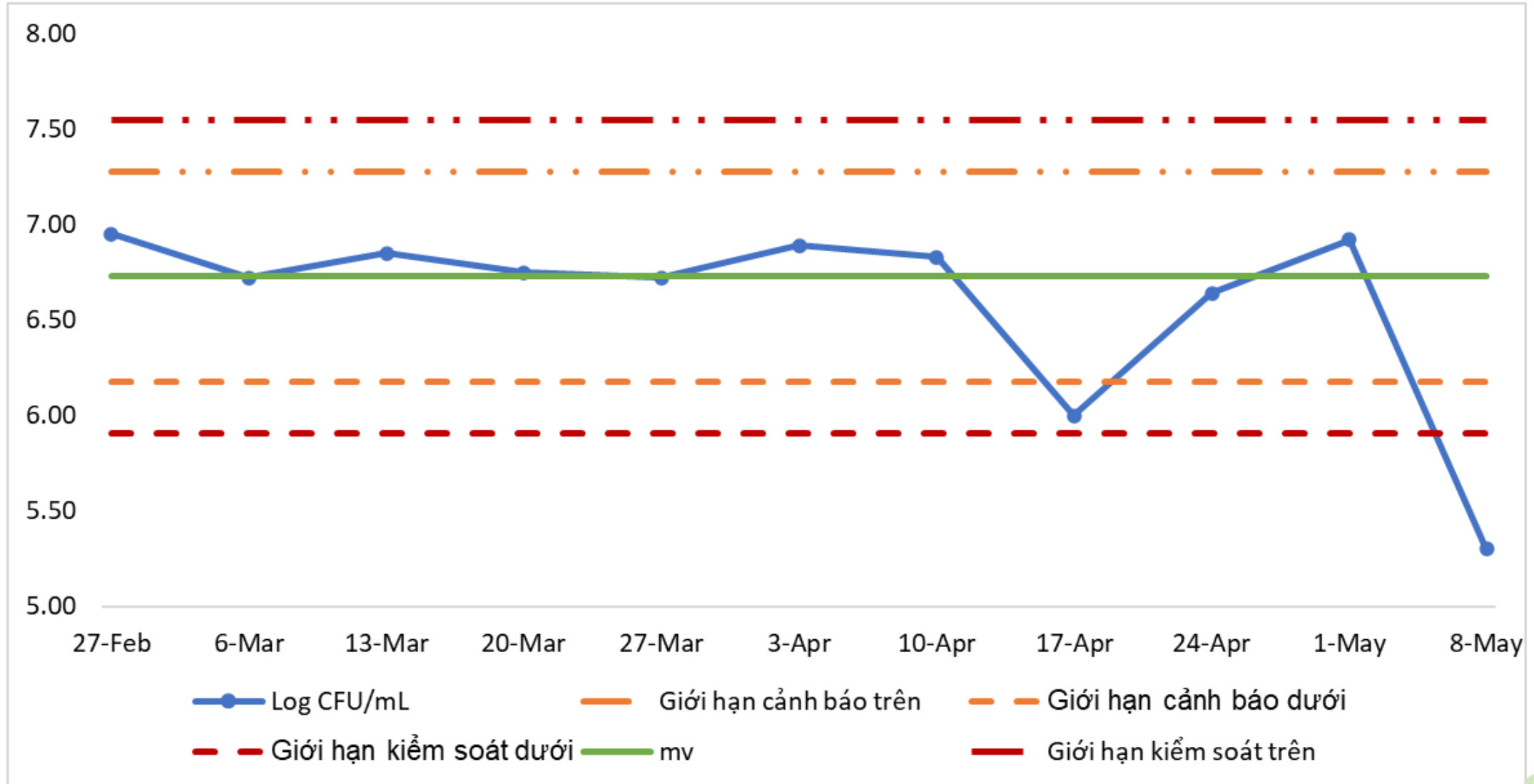
Ví dụ 2



Mẫu	Ngày thực hiện	Log CFU/mL	$(x - mv)$	$(x - mv)^2$
1	27-Feb	6.95	0.22	0.0497
2	6-Mar	6.72	-0.01	0.0000
3	13-Mar	6.85	0.12	0.0151
4	20-Mar	6.75	0.02	0.0005
5	27-Mar	6.72	-0.01	0.0000
6	3-Apr	6.89	0.16	0.0266
7	10-Apr	6.83	0.10	0.0106
8	17-Apr	6.00	-0.73	0.5285
9	24-Apr	6.64	-0.09	0.0076
10	1-May	6.92	0.19	0.0372
11	8-May	5.30	-1.43	2.0363

mv	6.73
s	0.3
Giới hạn cảnh báo trên	7.28
Giới hạn cảnh báo dưới	6.18
Giới hạn kiểm soát trên	7.55
Giới hạn kiểm soát dưới	5.90

Ví dụ 2: Chỉ tiêu TPC trong thịt- **RM/CRM**





XIN CHÂN THÀNH CẢM ƠN!