



Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia



**THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP GIÁM SÁT VỆ SINH
THỰC HIỆN TRÊN THIẾT BỊ LUCIPAC A3
THÔNG QUA PHÁT HIỆN ATP, ADP VÀ AMP**

1

**Nguyên tắc hoạt động
và các bước tiến hành**

2

**Các thông số thẩm
định:**

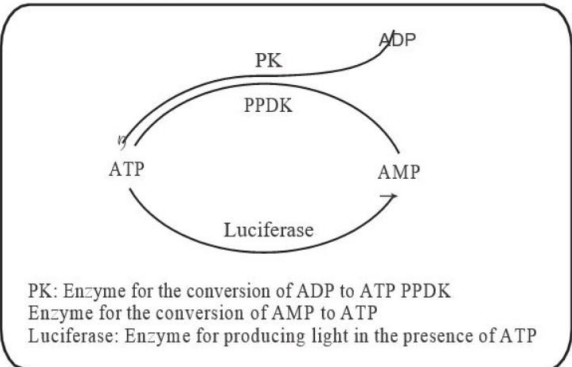
1. Độ chọn lọc
2. Đường chuẩn và LOD
3. Độ ổn định thiết bị
4. Độ vững
5. Ảnh hưởng của các chất sát khuẩn
6. Thực nghiệm trên nền mẫu

3

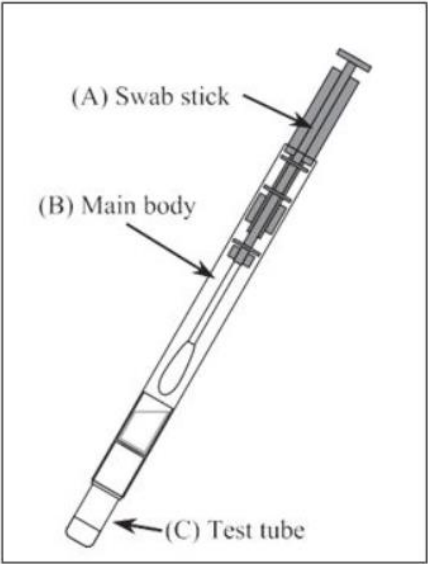
**Kết quả thẩm định
phương pháp**

1. Độ chọn lọc
2. Đường chuẩn và LOD
3. Độ ổn định thiết bị
4. Độ vững
5. Ảnh hưởng của các chất sát khuẩn
6. Thực nghiệm trên nền mẫu

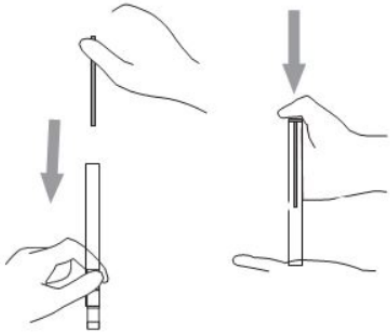
1. Nguyên tắc hoạt động và các bước tiến hành



Hình 1: Nguyên tắc của phương pháp phát quang sử dụng chu trình enzyme



Dùng que tăm bông quét bề mặt cần test theo đường zig zag



Đặt thân que chính (B) trên lòng bàn tay. Cho que tăm bông đã lấy mẫu ấn mạnh từ trên xuống cho thủng lớp nhôm, để que tăm bông (A) tiếp xúc với thuốc thử (C)



Lắc que theo phương thẳng đứng.



Lắc mạnh que cho đến khi thuốc thử bên trong que tan hết (C).



Bỏ que vào buồng đo của máy và đẩy nắp buồng đo lại.



Nhấn phím "ENTER" bắt đầu đo. Kết quả sẽ hiển thị sau 10 giây.

2. Các thông số thẩm định phương pháp



2.1 Các thông số thẩm định phương pháp

Độ chọn lọc

Mục tiêu: Phân tích mức độ ảnh hưởng của các hợp chất có cấu trúc tương tự lên tín hiệu phân tích

Thiết kế thí nghiệm:

NHÓM 1: 2500 fmol hợp chất tương tự

NHÓM 2: 2500 fmol hợp chất tương tự + 100 fmol của ATP/ADP/AMP

Hợp chất	RLU ở hợp chất 2500 fmol	RLU ở hợp chất 2500 fmol + 100 fmol		
		ATP	ADP	AMP
NA				
ATP				
ADP				
AMP				
dATP				
UTP				
GTP				
TTP				
dUTP				
CTP				
dGTP				
ITP				
dIMP				
dCTP				

2.2 Các thông số thẩm định phương pháp

Đường chuẩn và LOD

- Các bước tiến hành xây dựng đường chuẩn:

1. Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc ATP, ADP, AMP tại mức nồng độ 0,01 M.
2. Các dung dịch chuẩn làm việc được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc với nước không chứa nucleotide đến dãy nồng độ 1 nM, 250 pM, 100 pM, 50 pM, 25 pM và 10 pM
3. Mỗi mức nạp được lặp lại 10 lần để tính giá trị trung bình, độ lệch, độ lệch chuẩn

- Xác định LOD-LOQ:

$$LOD = \frac{\bar{X}_0 + 3.3 (s_b)}{1 - 1.65 m} \quad (1)$$

X_0 là giá trị phân tích trung bình của RLU, s_b là hệ số chặn và m là hệ số góc của biểu đồ.

2.3 Các thông số thẩm định phương pháp

- Các bước tiến hành :
 1. Ba thiết bị Lumitester Smart riêng biệt (Seri No 2209053130064S; 2209093130063S; 220909313006S)
 2. Tiến hành phân tích 3 mức ATP (0, 50, 500 fmol), mỗi mức được tiến hành lặp lại 5 lần trên 3 thiết bị (tắm ướt tấm bông bằng 100 µL các dịch phân tích).

ATP (fmol)	Thiết bị 1	Thiết bị 2	Thiết bị 3
0			
SD			
Trung bình			
RSD%			
50			
SD			
Trung bình			
RSD%			
500			
SD			
Trung bình			
RSD%			

2.4 Các thông số thẩm định phương pháp

Độ vững

Mục tiêu: khảo sát độ vững của phương pháp đo tác động của 2 yếu tố là nhiệt độ và thời gian lấy mẫu

Các bước tiến hành:

- Chuẩn bị tấm bông ở 12 ° C và 35 ° C qua đêm
- Trước khi thử nghiệm, cài chế độ bù nhiệt độ trên Lumitester Smart ở trạng thái BẬT.
- Thời gian lấy mẫu được tiến hành là 8 giây và 12 giây.
- Ghi nhận tín hiệu ATP ở 3 mức 0, 50, 500 fmol, mỗi điều kiện thí nghiệm được tiến hành làm lặp 5 lần (tắm ướt tấm bông bằng 100 µL các dịch phân tích).

ATP (fmol)	12 °C		35 °C		23 °C
	8s – Nhiệt độ thấp	12 giây - Nhiệt độ thấp	8s - Nhiệt độ cao	12s- Nhiệt độ cao	10 giây
0					
SD					
Trung bình					
RSD%					
50					
SD					
Trung bình					
RSD%					
500					
SD					
Trung bình					
RSD%					

2.5 Các thông số thẩm định phương pháp

Ảnh hưởng của chất sát khuẩn

- Tiến hành đánh giá mức độ ức chế của các chất sát khuẩn bằng cách pha loãng 3 chất sát khuẩn đại diện đến khoảng nồng độ làm việc của từng chất bằng nước vô trùng không chứa chất phân tích
- Thấm ẩm giấy Prowipe S220 bằng 2 mL của từng dung dịch pha loãng của các chất khử trùng
- Nhỏ giọt 100 μL chuẩn ATP 100 và 400 fmol/mL và rải lên bề mặt của tấm thép khô. Thí nghiệm được lặp lại 5 lần tương ứng với 5 bản thép ko gỉ được chuẩn bị của mỗi mức ATP cho từng loại chất khử trùng

$$\% \text{ Inhibition} = \left(1 - \frac{SA - S}{CA - C} \right) \times 100 \quad (2)$$

SA là tín hiệu từ thấm thép lau bề mặt dung chất khử trùng và ATP, S là tín hiệu từ thấm thép lau bề mặt dùng chất khử và nước, CA là tín hiệu từ thấm thép lau bề mặt bằng nước và ATP và C là tín hiệu từ thấm thép lau bề mặt bằng nước và thêm nước

2.6 Các thông số thẩm định phương pháp

Thực nghiệm trên một số nền mẫu

1. Chuẩn bị 4 mức độ ô nhiễm (cao, trung bình, thấp và rất thấp): cách pha loãng dịch chiết thích hợp với nước vô trùng không chứa chất phân tích, mức độ ô nhiễm được miêu tả trong bảng bên
2. Nhỏ 250 μ L dịch pha loãng lên bề mặt thép ko gỉ 10 x 10 cm (SUS304). Các tấm thép sau đó được để khô tự nhiên tại nhiệt độ phòng.
3. Dùng tăm bông ẩm tiến hành lấy mẫu bằng cách lau 10 lần theo chiều dọc và 10 lần theo chiều ngang trên bản thép sau đo kết quả trên thiết bị Lumitester Smart.

Số thứ tự	Mức độ	Mục tiêu RLU
1	Cao	1000-500
2	Giữa	500-150
3	Thấp	150-70
4	Rất thấp	<70

3. Kết quả thẩm định phương pháp

Độ chọn lọc

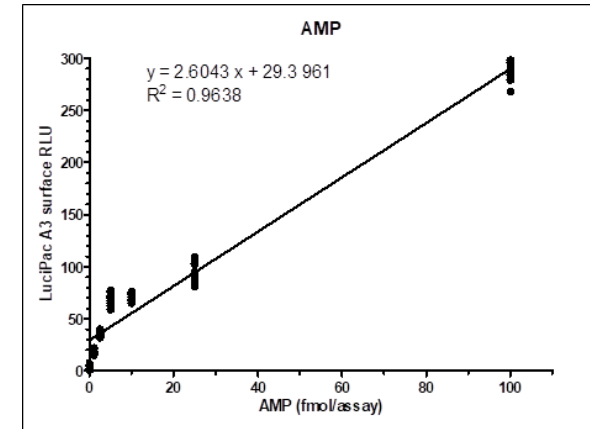
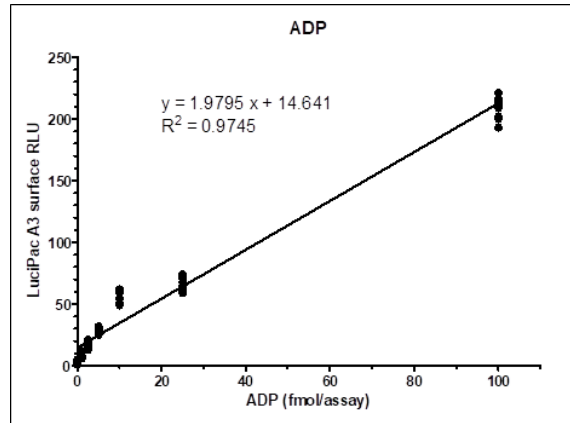
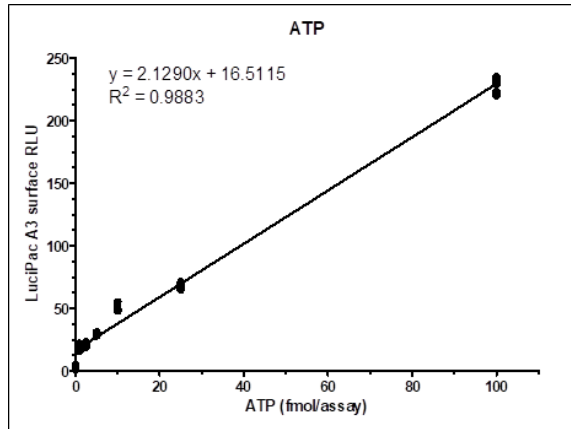
Hợp chất	RLU ở hợp chất 2500 fmol	RLU ở hợp chất 2500 fmol + 100 fmol		
		ATP	ADP	AMP
NA	5	178	227	182
ATP	4387	4408	4628	4625
ADP	5081	5618	6010	4260
AMP	4285	4666	4671	4921
dATP	46	186	272	219
UTP	48	210	225	249
GTP	33	204	231	227
TTP	94	342	274	259
dUTP	64	247	294	278
CTP	64	228	301	288
dGTP	61	235	299	295
ITP	98	265	325	289
dIMP	76	255	324	328
dCTP	56	223	281	232

Tất cả các RLU từ các hợp chất liên quan ở 2500 fmol đều thấp hơn RLU tạo ra bởi 100 fmol ATP, ADP hoặc AMP (lần lượt là 178, 227 và 182 RLU).

=> Hiện tượng này cho thấy không có phản ứng chéo nào được nhìn thấy bởi các hợp chất liên quan

3. Kết quả thẩm định phương pháp

Đường chuẩn và LOD



- ✓ Đường chuẩn ATP cho thấy hệ số xác định cao nhất ($R^2 = 0,9883$), trong khi đường chuẩn AMP có giá trị R^2 thấp hơn là 0,9638.
- ✓ Sự giảm mức độ tuyến tính của đường chuẩn AMP là do sự giảm tín hiệu RLU không tương đương với mức độ giảm của AMP ở các mức nồng độ thấp (< 10 fmol). Cụ thể, kiểm tra T-test cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (giá trị $p = 0,2195$) giữa các tín hiệu RLU ở 10 fmol và 5 fmol

3. Kết quả thẩm định phương pháp

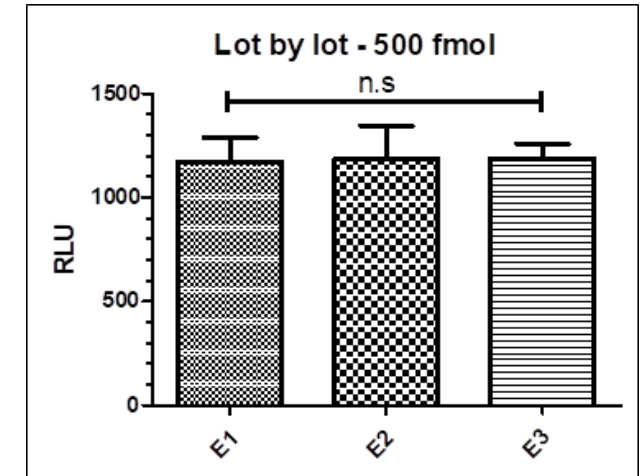
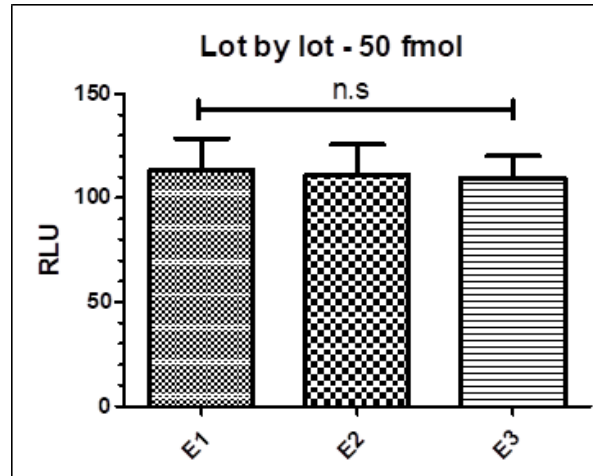
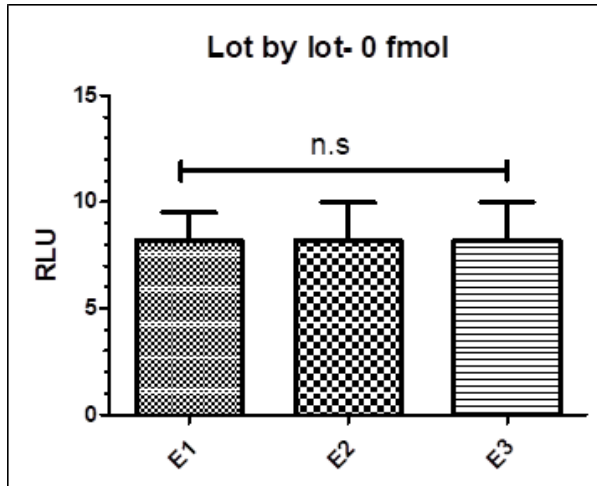
Đường chuẩn và LOD

Ước tính giới hạn phát hiện (LOD) đối với adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) và adenosine monophosphate (AMP)

Adenylate	giá trị trung bình của RLU	Sb	Độ dốc	LOD được tính toán	
				RLU	fmol / assay
ATP	3,7	1,0512	0,0209	7,4	4,3
ADP	3,9	2,0241	0,0364	11,3	1,8
AMP	4,0	2,8206	0,0258	13,9	6,0

3. Kết quả thẩm định phương pháp

Độ ổn định thiết bị



Một chiều - Kiểm tra ANOVA của nghiên cứu độ ổn định giữa các lô thiết bị

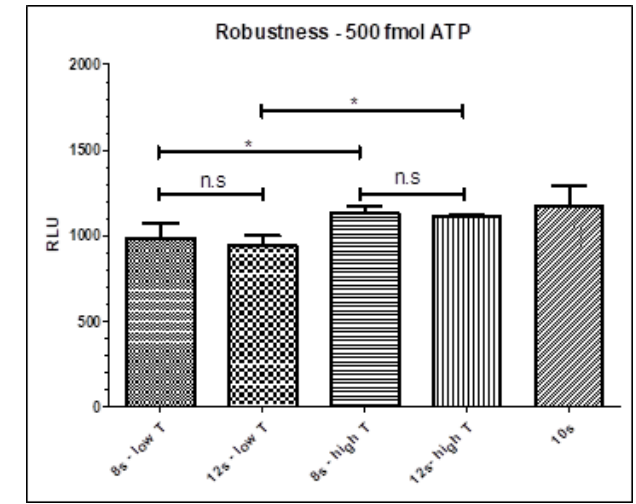
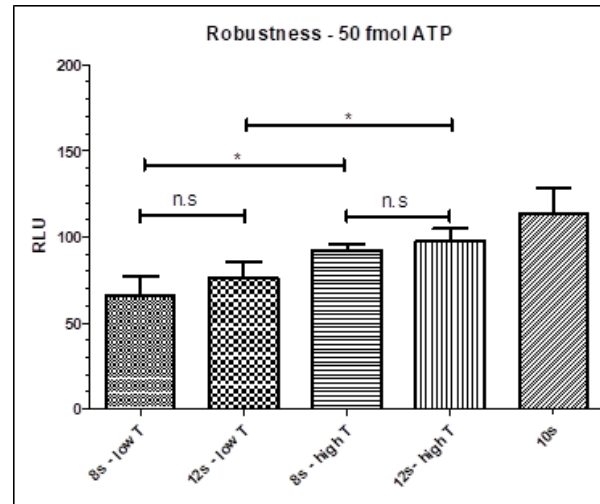
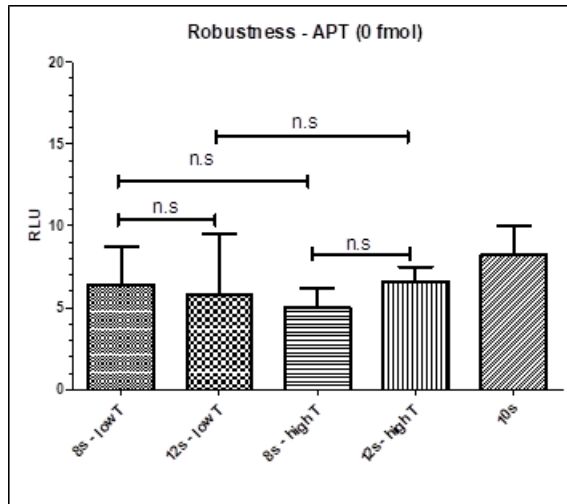
- ✓ ANOVA cho thấy không có sự khác biệt đáng kể giữa ba lô thiết bị

3. Kết quả thẩm định phương pháp

ATP (fmol)	12 °C		35 °C		23 °C
	8s – Nhiệt độ thấp	12 giây -Nhiệt độ thấp	8s - Nhiệt độ cao	12s- Nhiệt độ cao	10 giây
0	5	3	5	7	8
	4	11	4	7	6
	6	8	4	7	8
	10	2	5	5	11
	7	5	7	7	8
SD	2.3	3.7	1.2	0.9	1.8
Trung bình	6.4	5.8	5.0	6.6	8.2
RSD%	36.0	63.8	24.5	13.6	21.8
50	69	60	95	94	118
	82	83	95	97	98
	53	82	93	95	125
	57	81	87	110	96
	67	75	93	92	129
SD	11.3	9.6	3.3	7.2	15.3
Trung bình	65.6	76.2	92.6	97.6	113.2
RSD%	17.3	12.6	3.5	7.3	13.5
500	1090	849	1129	1114	1030
	898	966	1119	1130	1186
	908	975	1089	1107	1106
	979	917	1176	1091	1337
	1057	999	1171	1106	1207
SD	86.2	59.5	36.6	14.2	115.3
Trung bình	986.4	941.2	1136.8	1109.6	1173.2
RSD%	8.7	6.3	3.2	1.3	9.8

3. Kết quả thẩm định phương pháp

Độ ổn định thiết bị



Kết quả One-way ANOVA của nghiên cứu độ vững của phương pháp

- ✓ Ở 12 °C hoặc 35 °C với trạng thái bù nhiệt độ BẬT, không có sự khác biệt đáng kể nào do lấy mẫu thời gian là 8 giây hoặc 10 giây.
- ✓ Giá trị RLU trung bình ở mức 35°C cao hơn 1,15-1,41 lần (* $p < 0,05$) so với giá trị RLU trung bình ở mức 12°C.

3. Kết quả thẩm định phương pháp

Ảnh hưởng của chất sát khuẩn

	Nước		100 fmol ATP		400 fmol ATP		%In L1	%In L2
	W-W	W-In	ATP-W	ATP-In	ATP-W	ATP-In		
Natri hypochlorit	18.6	18.4	175.2	190.8	438.4	655.8	-10	-52
axit peracetic	18.6	125.0	175.2	397.4	438.4	1746.2	-74	-286
Amoni bậc bốn	18.6	21.6	175.2	299.0	438.4	363.4	-77	19

- ✓ Cả 3 chất sát khuẩn đều có khả năng gây ức chế phát hiện ATP ở các mức độ khác nhau
- ✓ Phần trăm ức chế của natri hypochlorite ở 400 fmol ATP cao hơn 5,2 lần so với ở 100 fmol ATP.
- ✓ Acid peracetic cho thấy hoạt tính ức chế mạnh, với phần trăm ức chế lần lượt là 74% và 286% ở 100 fmol và 400 fmol ATP.
- ✓ Benzalkonium ức chế phát hiện ATP ở 100 fmol (% inhibitor = 77%) nhưng không ức chế ở 400 fmol

3. Kết quả thẩm định phương pháp

Thực nghiệm trên nền mẫu thực

Nền mẫu	RLU mục tiêu	RLU trung bình	SD	RSD%
Thịt bò	1000-500	703.1	34.1	4.9
	500-200	235.1	37.3	15.9
	200-75	119.7	4.0	3.4
	<75	52.7	18.1	34.4
	BG	12.4	4.9	39.5
Nước cam	1000-500	653.5	45.8	7.0
	500-200	174.6	8.6	4.9
	200-75	65.3	7.6	11.6
	<75	39.4	6.3	16.0
	BG	13.6	4.0	29.2
Sữa chua	1000-500	771.4	84.6	11.0
	500-200	166.3	21.6	13.0
	200-75	73.7	5.8	7.9
	<75	25.1	2.7	10.7
	BG	7.4	3.9	52.2
Xúc xích	1000-500	777.1	57.6	7.4
	500-200	172.3	11.5	6.7
	200-75	71.4	2.0	2.8
	<75	39.6	8.1	20.4
	BG	9.9	3.8	38.8
Sôcôla	1000-500	624.1	25.2	4.0
	500-200	162.5	11.9	7.3
	200-75	76.0	11.4	15.0
	<75	40.7	9.4	23.2
	BG	10.8	4.2	38.5

Kết luận

Kết quả thẩm định phương pháp cho thấy:

- ✓ Phương pháp đạt về độ chọn lọc
- ✓ Giới hạn phát hiện của ATP-ADP-AMP lần lượt là 7,4 – 11,3- 13,9 RLU với độ tuyến tính đạt $R^2 > 0.95$
- ✓ Độ ổn định thiết bị đạt
- ✓ Độ vững do nhiệt độ và thời gian phân tích tốt
- ✓ Ảnh hưởng bởi các chất sát khuẩn được xác định
- ✓ Độ lặp lại trên nền mẫu thực tốt

XIN TRÂN TRỌNG CẢM ƠN!