

## Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp PCR phát hiện *Campylobacter jejuni* và *Campylobacter coli* trong sữa bột

Nguyễn Đỗ Phúc\*, Nguyễn Lý Hoàng Ngân, Lê Thị Hiền, Ngô Thanh Phong,  
Trần Bảo Trâm, Nguyễn Ngọc Thanh Hiền, Nguyễn Thị Thanh Trúc, Hoàng Hoài Phương  
Viện Y tế công cộng Thành phố Hồ Chí Minh

(Ngày đến tòa soạn: 05/9/2022; Ngày chấp nhận đăng: 21/9/2022)

### Tóm tắt

Một phương pháp thay thế dựa trên kỹ thuật PCR để phát hiện nhanh *Campylobacter jejuni* và *Campylobacter coli* trên nền mẫu sữa bột được xác nhận giá trị sử dụng theo các yêu cầu của TCVN 12365-2:2018 (ISO 16140-2:2016). Trong bài báo này, nghiên cứu bắt cặp được áp dụng để xác định các thông số: (1) độ nhạy (độ nhạy của phương pháp thay thế, độ nhạy của phương pháp tham chiếu, độ đúng tương đối, tỷ lệ dương tính giả của phương pháp thay thế), (2) giới hạn phát hiện tương đối và (3) độ chọn lọc (chọn lọc mục tiêu và chọn lọc không mục tiêu) của phương pháp thay thế. Kết quả cho thấy độ nhạy của phương pháp thay thế là 85,7%, độ nhạy của phương pháp tiêu chuẩn là 92,8%; độ đúng tương đối là 85%, tỷ lệ dương tính giả của phương pháp thay thế là 16,7%; giới hạn phát hiện tương đối là 0,859. Phương pháp thay thế phát hiện được các chủng mục tiêu và không phát hiện tất cả các chủng không mục tiêu. Tất cả các thông số thử nghiệm xác nhận giá trị sử dụng phương pháp theo TCVN 12365-2:2018 (ISO 16140-2: 2016) đều đạt yêu cầu.

**Từ khóa:** *Campylobacter spp.*, xác nhận giá trị sử dụng phương pháp PCR, sữa bột, ISO 16140-2:2016.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiều loài *Campylobacter* có khả năng gây bệnh truyền qua thực phẩm như: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* và *C. upsaliensis*... Trong số này, *C. jejuni* và *C. coli* thường được phát hiện trong thực phẩm và người bệnh tiêu chảy. Bên cạnh các loại thực phẩm có nguồn gốc từ động vật, sữa là một nguồn lây thường xuyên và quan trọng trong việc lan truyền *Campylobacter* đường ruột. Một vụ dịch do *Campylobacter* được phát hiện ở những người sử dụng sữa chưa tiệt trùng (sữa này được lấy từ 2 con bò bị viêm nhũ do *Campylobacter*). Một báo cáo ở New Zealand cho thấy có 50 trong số 88 trẻ bị tiêu chảy do sữa nguyên liệu bị nhiễm *C. jejuni*. Trong một hội thảo đi bộ ở Thụy Sĩ, có 500 người sử dụng thức uống được pha với sữa nguyên liệu bị nhiễm *C. jejuni*, với tỷ lệ nhiễm lên đến 75%. Một vụ dịch viêm ruột khác mà nguyên nhân cũng do *C. jejuni* gây ra cho những người sử dụng sữa chưa tiệt trùng với tỷ lệ nhiễm bệnh 50% [3].

\* Điện thoại 0907669008 Email: [nguyendophucihph@gmail.com](mailto:nguyendophucihph@gmail.com)

Phương pháp tiêu chuẩn phát hiện *C. jejuni* và *C. coli* trong thực phẩm đang được áp dụng phổ biến hiện nay trong các phòng kiểm nghiệm vi sinh thực phẩm là phương pháp nuôi cấy truyền thống dựa theo ISO 10272-1:2017 [1]. Phương pháp này bao gồm bốn bước chính: tăng sinh mẫu thử trên môi trường tăng sinh chọn lọc trong điều kiện vi hiếu khí, phân lập trên đĩa thạch, thử nghiệm khẳng định (hình thái/di động, oxidase, không mọc hiếu khí ở 25°C,) và bước định loài vi khuẩn (Catalase, Hippurate, Indoxyl acetate). Phương pháp nuôi cấy truyền thống này mất nhiều thời gian (6-7 ngày nếu mẫu dương tính), không thể áp dụng trong một số trường hợp cần kết quả nhanh. Do đó, những phương pháp thay thế, phát hiện nhanh *C. Jejuni* và *C. coli* trong thực phẩm như phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction) là rất cần thiết. Phương pháp multiplex PCR phát hiện *C. jejuni* và *C. coli* trong thực phẩm được xây dựng bởi EURL-AR dựa trên sự khuếch đại hai gen *mapA* *C. jejuni* và *ceuE* *C. coli* cùng với gen *16S* như chứng nội tại để kiểm tra chất lượng quá trình tách chiết DNA và phân tích mẫu. Phương pháp multiplex PCR này bao gồm hai bước: bước đầu tiên là tăng sinh mẫu thử trên môi trường tăng sinh chọn lọc trong điều kiện vi hiếu khí và bước thứ hai là tách chiết DNA từ dịch tăng sinh chọn lọc bằng phương pháp đun sôi, sau đó chạy PCR khuếch đại các gen đặc hiệu loài *mapA* *C. jejuni* và *ceuE* *C. coli* cùng với gen *16S*. Trường hợp mẫu dương tính, phương pháp PCR sẽ cho kết quả vào ngày thứ 3, còn phương pháp nuôi cấy sẽ cho kết quả vào ngày thứ 6 hoặc thứ 7. Trường hợp mẫu âm tính, phương pháp PCR cũng cho kết quả vào ngày thứ 3, nhưng phương pháp nuôi cấy sẽ cho kết quả vào ngày thứ 4. Việc sử dụng phương pháp PCR (phương pháp thay thế) trong phòng thí nghiệm chỉ cho phép khi chúng được xác nhận giá trị sử dụng theo các quy định của TCVN 12365-2:2018 (ISO 16140-2: 2016) và theo yêu cầu công nhận các phòng thử nghiệm lĩnh vực sinh của văn phòng công nhận chất lượng [2].

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác nhận giá trị sử dụng phương pháp thay thế dựa trên kỹ thuật PCR để phát hiện nhanh vi khuẩn *C. jejuni* và *C. coli* trên nền sữa bột so với phương pháp tham chiếu (ISO 10272-1:2017) theo các thông số: (1) độ nhạy (độ nhạy của phương pháp thay thế:  $SE_{alt}$ , độ nhạy của phương pháp tham chiếu:  $SE_{ref}$ , độ đúng tương đối: RT, tỷ lệ dương tính giả của phương pháp thay thế: FPR); (2) giới hạn phát hiện tương đối (RLOD: Relative Limit of Detection) và (3) độ chọn lọc (chọn lọc mục tiêu và chọn lọc không mục tiêu) của phương pháp thay thế theo tiêu chuẩn TCVN 12365-2:2018 (ISO 16140-2: 2016).

## 2. VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

**Mẫu thực phẩm:** Mẫu sữa bột

**Chủng chuẩn:**

**Chủng vi sinh vật mục tiêu:** gồm 2 chủng: *Campylobacter jejuni* ATCC 33291, *Campylobacter coli* ATCC 43478.

Chủng vi sinh vật không mục tiêu : 20 chủng, gồm (1) *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, (2) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, (3) *Enterococcus faecium* ATCC 35667, (4) *Escherichia coli* ATCC 25922, (5) *Escherichia coli* ATCC 35218, (6) *Escherichia coli* ATCC 8739, (7) *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603, (8) *Listeria monocytogenes* serovar 2 ATCC 19112, (9) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, (10) *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* ATCC 29213, (11) *Vibrio furnissii* NCTC 11218, (12) *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, (13) *Vibrio vulnificus* ATCC 27562, (14) *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* ATCC 9610, (15) *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, (16) *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, (17) *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13882, (18) *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* ATCC 13314, (19) *Pseudomonas aeruginosa* PAKG 2239, (20) *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048.

## 2.2. Môi trường, chất chuẩn

**Hóa chất cho nuôi cấy:** canh thang Bolton chọn lọc (Merck, Đức, môi trường có bổ sung máu ngựa 5% và Bolton selective enrichment, Oxoid, UK), thạch mCCD (Merck, Đức); môi trường thạch Columbia (Merck, Đức) bổ sung 5% máu cừu, canh thang Brucella (Oxoid, Anh), que thử phát hiện oxidase (Merck, Đức), dung dịch hydro peroxit 30% (Merck, Đức), thuốc thử phát hiện thủy phân hipurat: natri hippurat và ninhydrin (Merck, Đức), đĩa indoxyl axetat (Himedia, Ấn Độ), túi tạo khí trường vi hiếu khí (Oxoid, Anh) [4].

**Hóa chất cho phản ứng PCR:** 3 cặp mồi xuôi và ngược đặc hiệu cho gen *mapA<sub>C.jejuni</sub>*, *ceuE<sub>C.coli</sub>* và *16S: MDmapA1, MDmapA2, COL3, MDCOL2, 16S primer 804 RX, 16S primer 10FX* với nồng độ mỗi mồi 0,2  $\mu$ M (IDT, Mỹ), hỗn hợp dùng trong phản ứng khuếch đại PCR: GoTaq® G2 Green Master Mix (Promega, Mỹ), thang DNA 100 bp (TaKara, Nhật), Tris base (Promega, Mỹ), Ethylenediaminetetraacetic acid - EDTA (Sigma-Aldrich, Mỹ), agarose (ABM, Canada), Tris-acetate-EDTA - TAE (Fisher, Anh), chất nhuộm DNA Diamond™ nucleic acid dye (Promega, Mỹ) [5].

## 2.3. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nuôi cấy phát hiện *C. jejuni* và *C. coli* theo ISO 10272-1:2017 (phương pháp tham chiếu) [4] và phương pháp phát hiện *C. jejuni* và *C. coli* theo EURL-AR 2<sup>nd</sup> version - November 2013 (phương pháp thay thế) [5]. Xác nhận giá trị sử dụng phương pháp PCR phát hiện *C. jejuni* và *C. coli* dựa theo tiêu chuẩn TCVN 12365-2:2018 (ISO 16140-2:2016) [1].

### 2.3.1. Phương pháp nghiên cứu độ đáp ứng

Trong nghiên cứu cặp đôi: sử dụng 2 phương pháp là phương pháp nuôi cấy truyền thống và phương pháp multiplex-PCR để phân tích cùng 1 phần mẫu sữa bột. Tổng số mẫu cần phân tích là 20 mẫu được gây nhiễm với mức nhiễm thấp là mức nhiễm cho tỷ lệ mẫu dương tính trong khoảng từ 25% đến 75% bởi phương pháp chuẩn và/hoặc phương pháp thay thế; các mẫu thử cho kết quả dương tính bằng phương pháp thay thế nhưng âm tính bởi phương pháp chuẩn-phải được khẳng định lại bằng phương pháp thay thế. Kết quả ghi nhận

từ 2 phương pháp được sử dụng để tính độ nhạy phương pháp thay thế ( $SE_{alt}$ ), phương pháp chuẩn ( $SE_{ref}$ ), độ đúng tương đối (RT) và tỷ lệ dương tính giả của phương pháp thay thế (FPR) theo công thức quy định trong ISO 16140-2: 2016. Các kết quả nghiên cứu cặp đôi được so sánh với giới hạn chấp nhận cho một nền mẫu để đánh giá độ đáp ứng của phương pháp PCR. Giới hạn chấp nhận cho 1 nền mẫu khảo sát được quy định là tổng số mẫu cho kết quả lệch âm và lệch dương ( $ND + PD$ ) không vượt quá 6; và hiệu số mẫu cho kết quả lệch âm và lệch dương ( $ND - PD$ ) không vượt quá 3.

### 2.3.2. Phương pháp xác định giới hạn phát hiện tương đối (RLOD)

Gây nhiễm chủng chuẩn vào mẫu sữa bột: chủng được tăng sinh trên môi trường canh thang Bolton và kiểm tra nồng độ vi khuẩn bằng phương pháp đo độ đục. Cân 30 mẫu sữa bột mỗi mẫu 25 gam thêm 225 mL canh thang Bolton và được gây nhiễm như sau: mức 1: 5 mẫu đối chứng âm, không nhiễm chủng; mức 2 (mức nhiễm thấp): 20 mẫu (được nhiễm chủng với nồng độ sao cho có khoảng 25 - 75% mẫu thử cho kết quả dương tính theo phương pháp chuẩn. Mức 3 (mức nhiễm cao) 5 mẫu cao hơn mức nhiễm thấp sao cho tất cả các mẫu đều cho kết quả dương tính bởi cả hai phương pháp. Sử dụng cả 2 phương pháp để cùng phân tích tất cả 30 mẫu. Các mẫu đối chứng âm phải cho kết quả âm tính. Khi có bất kỳ một mẫu đối chứng âm nào cho kết quả dương tính, thí nghiệm phải được lặp lại đối với tất cả 3 mức nhiễm. Mẫu cho kết quả lệch dương bởi phương pháp thay thế phải được khẳng định lại. Giới hạn phát hiện tương đối được tính sau khi có kết quả khẳng định.

Tính kết quả RLOD: Nhập các kết quả phân tích vào file excel “RLOD\_MCS\_clause\_5-1-4-2\_V3\_2015-08-15.xls” (<https://standards.iso.org/iso/16140/-2/ed-1/en/>). Giá trị RLOD này không vượt quá ngưỡng chấp nhận AL của nghiên cứu cặp đôi là phương pháp PCR không vượt quá 1,5 lần so với phương pháp nuôi cấy.

### 2.3.3. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu và không mục tiêu

Cân 23 mẫu sữa bột, mỗi mẫu 25 gam thêm 225 mL canh thang Bolton chọn lọc. Nhiễm mỗi chủng mục tiêu và không mục tiêu vào mỗi phần mẫu. Đối với 2 chủng mục tiêu, nhiễm mỗi chủng vào một phần mẫu (2 mẫu), nhiễm cả 2 chủng vào 1 phần mẫu (1 mẫu), với mức nhiễm gấp 100 lần với mức phát hiện tối thiểu (1 CFU/mẫu) :  $100 \times 1 \text{ CFU} = 100 \text{ CFU/ mẫu}$ . Đối với 20 chủng không mục tiêu, nhiễm mỗi chủng vào 1 phần mẫu (20 mẫu), với mức nhiễm  $10^4 \text{ CFU/ 1 phần mẫu}$ . Mỗi mẫu được phân tích một lần bằng phương pháp thay thế (phương pháp multiplex - PCR).

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Kết quả nghiên cứu độ đáp ứng của phương pháp PCR với phương pháp nuôi cấy

Theo Bảng 1, kết quả giữa phương pháp chuẩn (phương pháp nuôi cấy) và phương pháp PCR (phương pháp thay thế) phát hiện *C. jejuni* và *C. coli*; khi phân tích song song từ 2 phương pháp có giai đoạn tăng sinh giống nhau, kết quả cho thấy độ phù hợp dương của 2 phương pháp là 11 mẫu (PA), độ phù hợp âm là 6 mẫu (NA), độ lệch dương là 1 mẫu (PD) và độ lệch âm là 2 mẫu (ND). Kết quả nghiên cứu độ đáp ứng thu được như sau:

Độ nhạy của phương pháp thay thế:  $SE_{alt} = [(PA+PD) / (PA+ND+PD)] \times 100\% = 85,7\%$

Độ nhạy của phương pháp tiêu chuẩn:  $SE_{ref} = [(PA+ND) / (PA+ND+PD)] \times 100\% = 92,8\%$

Độ đúng tương đối:  $RT = [(PA+NA)/N] \times 100\% = 85\%$

Tỷ lệ dương tính giả đối với phương pháp thay thế:  $FPR = (FP/NA) \times 100\% = 16,7\%$

Trong đó:  $N = NA + PA + ND + PD$ : tổng số mẫu

FP: Số mẫu dương tính giả của phương pháp thay thế

Đây là nghiên cứu cặp đôi, phương pháp PCR được đánh giá dựa trên các thông số (ND - PD) và (ND + PD). Với kết quả thu nhận từ Bảng 1, kết quả ND + PD = 3; ND - PD = 1; so với giới hạn chấp nhận cho 1 nền mẫu khảo sát không vượt quá ND + PD là 6 và ND - PD là 3. Như vậy phương pháp PCR phát hiện *C. jejuni* và *C. coli* đạt yêu cầu.

**Bảng 1.** Kết quả phân tích *C. jejuni* và *C. coli* theo phương pháp nuôi cấy và phương pháp PCR

		<i>Phương pháp nuôi cấy (tiêu chuẩn)</i>	
		<i>Dương tính (R+)</i>	<i>Âm tính (R-)</i>
<b>Phương pháp PCR</b> (phương pháp thay thế)	<b>Dương tính (A+)</b>	11 (PA)	1 (PD)
	<b>Âm tính (A-)</b>	2 (ND)	6 (NA)

### 3.2. Kết quả xác định giới hạn phát hiện tương đối (RLOD)

Chủng chuẩn *C. jejuni* được tăng sinh trên môi trường canh thang Bolton chọn lọc và kiểm tra nồng độ vi khuẩn. Kết quả thu nhận được cho mức 2 gây nhiễm vào 20 mẫu là 2 CFU/mL và mức 3 là 3CFU/mL và mức 1 là 5 mẫu không gây nhiễm. Kết quả phân tích 30 mẫu sữa bột của 3 mức nhiễm bằng hai phương pháp được trình bày ở Bảng 2.

**Bảng 2.** Kết quả phân tích các mức nhiễm *C. jejuni* và *C. coli* vào mẫu sữa theo phương pháp PCR và phương pháp nuôi cấy

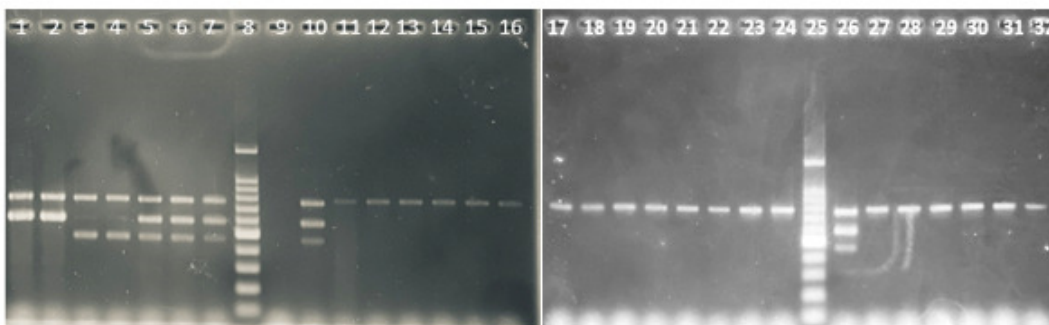
	<i>Kết quả của phương pháp PCR</i>	<i>Kết quả của phương pháp nuôi cấy</i>
Mức 1: 5 mẫu mẫu đối chứng âm (không nhiễm)	5 (-)	5 (-)
Mức 2: 20 mẫu (mức gây nhiễm 2 CFU/mL)	8 (-) và 12 (+)	7 (-) và 13 (+)
Mức 3: 5 mẫu (mức gây nhiễm 3 CFU/m)	5 (+)	5 (+)

Số liệu từ kết quả Bảng 2 được nhập liệu vào file excel “RLOD\_MCS\_clause\_5-1-4-2\_V3\_2015-08-15.xls”. Kết quả RLOD là 0,859. Giá trị RLOD của phương pháp PCR này không vượt quá ngưỡng giới hạn chấp nhận cho nghiên cứu cặp đôi là 1,5 lần so với phương pháp nuôi cấy. Như vậy giới hạn phát hiện của phương pháp PCR phát hiện *C. jejuni* và *C. coli* đạt yêu cầu.



### 3.3. Kết quả xác định độ chọn lọc của phương pháp PCR

Phân tích 2 mẫu sữa bột gây nhiễm với riêng từng chủng *C. jejuni*, *C. coli*, 1 mẫu sữa bột gây nhiễm cả 2 chủng *C. Jejuni* và *C. coli* và 20 mẫu sữa bột gây nhiễm 20 chủng không mục tiêu (mục 2.1) bằng phương pháp PCR. Kết quả ghi nhận ở Hình 1.



**Hình 1.** Kết quả phân tích bằng kỹ thuật PCR phát hiện *C.jejuni* và *C. coli* trong mẫu bột sữa

**Giếng 1,2:** Các mẫu sữa bột nhiễm *C. jejuni* dương tính gen *mapA* 589 bp và gen *16 s* 800 bp. **Giếng 3,4:** Các mẫu sữa b nhiễm *C. coli* dương tính gen *ceuE* 462 bp và gen *16 s* 800 bp. **Giếng 5, 6, 7:** Các mẫu sữa bột nhiễm đồng thời *C. jejuni* và *C. coli* dương tính gen *mapA* 589 bp, *ceuE* 462 bp và gen *16 s* 800 bp. **Giếng 8, 25:** Thang 100 bp. **Giếng 9:** Chứng âm (nước cất), không xuất hiện băng. **Giếng 10, 26:** chứng dương (DNA của *C. jejuni* và *C. coli*) dương tính gen *mapA* 589 bp, *ceuE* 462 bp và gen *16 s* 800 bp. **Giếng 11 đến 24, giếng 27 đến 32:** lần lượt 20 chủng vi khuẩn không mục tiêu (mục 2.1)

Kết quả Hình 1 cho thấy với phương pháp PCR đã phát hiện cả 2 chủng *C. jejuni* và *C. coli* và 20 chủng không mục tiêu theo mục 2.1 đều cho kết quả âm tính. Như vậy phương pháp PCR phát hiện *Campylobacter* spp đặc hiệu và có thể áp dụng trong phân tích nhanh *C. jejuni* và *C. coli* trong mẫu sữa bột.

## 4. KẾT LUẬN

So với phương pháp nuôi cấy truyền thống, phương pháp PCR phát hiện *Campylobacter jejuni* và *Campylobacter coli* được xác nhận giá trị sử dụng tại nội bộ phòng thí nghiệm với kết quả như sau: (1) Nghiên cứu về độ đáp ứng (nghiên cứu bắt cặp): độ nhạy phương pháp PCR là 85,7%, độ nhạy của phương pháp tiêu chuẩn là 92,8%, độ đúng tương đối: 85%, tỷ lệ dương tính giả đối với phương pháp PCR là 16,7%, giới hạn phát hiện tương đối: 0,859. (2) Mức phát hiện tương đối (RLOD) của phương pháp PCR so với phương pháp tiêu chuẩn là 0,859. (3) Nghiên cứu mục tiêu và loại trừ: phương pháp PCR phát hiện các chủng mục tiêu và không phát hiện các chủng không mục tiêu. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở để áp dụng phương pháp PCR phát hiện *C. jejuni* và *C. coli* trong mẫu sữa bột.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. TCVN 12365-2:2018 (ISO 16140-2:2016): Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
- [2]. ARL 04, Supplementary requirement for accreditation in the field of biological testing, Accreditation Office, 2 January 2020.
- [3]. Hui Y. H., Pierson D., Richard Gorham J., *Foodborne Disease Hand Book*, Second Edition, volume 1, pp.83-106, 2001. Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method
- [4]. ISO 10272-1: 2017: Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method
- [5]. Protocol for PCR amplification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* recommended by the EURL-AR 2<sup>nd</sup> version - November 2013.

### **Validation of a PCR method for the detection *Campylobacter* spp. in milk powder**

**Nguyen Do Phuc, Nguyen Ly Hoang Ngan, Le Thi Hien, Ngo Thanh Phong,  
Tran Bao Tram, Nguyen Ngoc Thanh Hien, Nguyen Thi Thanh Truc, Hoang Hoai Phuong**  
*Institute of Public Health Ho Chi Minh City*

#### **Abstract**

An alternative PCR method for rapid detection of *Campylobacter* spp. in milk powder was validated according to TCVN 12365-2:2018 (ISO 16140-2:2016). In this study, performed with paired study, validation examines the following parameters: (1) sensitivity (sensitivity for the alternative method:  $SE_{alt}$ , sensitivity for the reference method:  $SE_{ref}$ , relative trueness: RT, false positive ratio for the alternative method: FPR), (2) relative level of detection (RLOD) and (3) inclusivity and exclusivity. The result showed that: sensitivity for the alternative method: 85.7%, sensitivity for the reference method 92.8%, relative trueness: 85%, false positive ratio for the alternative method: 16.7%, relative level of detection: 0,859 CFU/25g. For inclusivity testing, two reference strains were detected. For exclusivity testing, all of 20 strains were not detected. All the parameters tested were met according to TCVN 12365-2:2018 (ISO 16140-2: 2016) requirements.

**Keywords:** *Campylobacter* spp., validation, PCR, milk powder, ISO 16140-2:2016.