|  |  |
| --- | --- |
| TCVN | **T I Ê U C H U Ẩ N Q U Ố C G I A** |

DỰ THẢO TCVN :2019

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM - PHÁT HIỆN CYCLOSPORA VÀ CRYPTOSPORIDIUM TRONG THỰC PHẨM**

***Food chain – Detection of Cyclospora and Cryptosporidium from food***

**HÀ NỘI – 2019**

**Lời nói đầu**

TCVN.......:2019 được xây dựng trên cơ sở tham khảo tài liệu của Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (USFDA) *Bacteriological Analytical Manual. Chapter 19a: Detection of Cyclospora and Cryptosporidium from Fresh Produce: Isolation and Identification by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Microscopic analysis;*

TCVN.......:2019 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.

T I Ê U C H U Ẩ N Q U Ố C G I A TCVN......:2019

**Thực phẩm - Phát hiện Cyclospora và Cryptosporidium trong thực phẩm**

*Food chain – Detection of Cyclospora and Cryptosporidium from food*

**CẢNH BÁO – Người sử dụng tiêu chuẩn này phải thành thạo thực hành phòng thử nghiệm thông thường. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.**

**1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện *Cyclospora* và *Crpytosporidium* từ thực phẩm tươi sống và nước bằng phân tích trên kính hiển vi và kỹ thuật phản ứng chuỗi polymerase (PCR).

**2 Nguyên tắc**

Phương pháp này dựa vào việc phân tích trên kính hiển vi và xác định đoạn ADN đích được khuếch đại hay không. Quá trình xác định được thực hiện bằng phản ứng chuỗi (PCR) sơ cấp, phản ứng PCR lồng, Real-time PCR đa mồi, Real-time PCR đa mồi lồng với các cặp mồi đặc hiệu đối với *Cyclospora* và *Cryptosporidium*. Các sản phẩm khuếch đại được đo kích thước trên gel agarose hoặc phân tích đường cong tan chảy. Nếu trong mẫu có gen đích, trên bảng gel điện di sẽ xuất hiện sản phẩm khuếch đại có kích thước phù hợp với độ dài của đoạn ADN đích đã định. Nếu trong mẫu không có gen đích, trên gel diện di không xuất hiện sản phẩm khuếch đại hoặc sản phẩm khuếch đại có kích thước không phù hợp với đoạn ADN đích.

**3 Thuốc thử, môi trường và vật liệu thử**

Trong tiêu chuẩn này, sử dụng thuốc thử, môi trường và vật liệu thử sau đây:

**3.1 Nước**

**3.1.1 Nước khử ion**, dùng để rửa thực phẩm ([dH2O]).

**3.1.2 Nước khử ion vô trùng**, dùng cho quy trình PCR.

**3.2 Dung dịch đệm rửa giải Envirochek™** [[1]](#footnote-1)), có chứa Tris 0,01 M, pH 7,4; ethylendiamintetraacetat (EDTA) 0,001 M; natri dodecyl sulfat (SDS) 1 %.

**3.3 Mỡ silicon**.

**3.4 Albumin bò (BSA),** ví dụ: Sigma, A-7030 1).

**3.5 Celite**,ví dụ: Sigma, C-8656.

**3.6 Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP)** ví dụ: Sigma, P-6755.

**3.7 Bộ đệm NET**, có chứaTris 0,1 M, pH 8,0, NaCl 0,15 M, EDTA 0,001 M.

**3.8 Bộ đệm NET-BSA,** bộ đệm NET (3.7) chứa BSA (3.4) nồng độ 1 % (khối lượng/thể tích).

**3.9 Bộ đệm NET-BSA (3.8) chứa Celite (3.5)** nồng độ 20 % (khối lượng/thể tích).

**3.10 Huyền phù polyvinyl polypyrrolidone (PVPP)**,10 % (khối lượng/thể tích) trong dH2O (3.1.1).

**3.11 Bộ kit Dynabeads kháng *Cryptosporidium****,* ví dụ: Dynal Biotech Inc, Hoa Kỳ 1).

**3.12 Bộ kit phát hiện kết hợp hydrofluor đối với *Cryptosporidium* và *Giardia****,* ví dụ: Strategic Diagnostics, Inc 1).

**3.13 Dung dịch axit clohydric**, 0,1 N.

**3.14 Dung dịch natri hydroxit**, 0,1 N.

**3.15 Dầu ngâm.**

**3.16 Sơn móng tay, hợp chất trượt, sáp parafin hoặc tương đương.**

**3.17 Đệm lọc FTA***,* ví dụ: Whatman Biosciences 1).

**3.18 Đệm rửa màng lọc FTA**, có chứa Tris 0,01 M, pH 8,0; EDTA 0,1 mM.

**3.19 Đoạn mồi ADN**, xem Bảng 1.

**3.20 Master Mix**, ví dụ: Kit HotStartTaq™ (Qiagen) 2).

**3.21 Đệm 0,5x Tris-axetat-EDTA (0,5x TAE)**.

**3.22 Agarose**, loại dùng chosinh học phân tử, ví dụ: BioRad 2).

**3.23 Ethidium bromide.**

**3.24 Dung dịch nạp gel 6x.**

**3.25 Thang ADN**,100 bp và 25 bp, ví dụ: Invitrogen 2).

**3.26 Enzyme giới hạn *VspI***, ví dụ: Promega 2).

**3.27 Enzyme giới hạn *DraII***, ví dụ: Hoffman-La Roche 2).

**3.28 NuSieve® Agarose 3 : 1**, ví dụ:Biowhitaker Molecular Applications 2).

**3.29 Kit: LightCycler®-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics)** (tùy chọn).

**3.30 LightCycler® Capillaries (Roche Diagnostics)** (tùy chọn).

**3.31 LightCycler® System (Roche Diagnostics)** (tùy chọn).

**4 Thiết bị, dụng cụ**

Sử dụng thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm vi sinh và cụ thể như sau:

**4.1 Túi lọc**, dung tích400 ml, ví dụ: BagPage®+ củaInterscience, St Nom, Pháp [[2]](#footnote-2)) vàkẹp túi.

**4.2 Viên nang lấy mẫu**, kích thước danh định 1 µm,ví dụ: Envirochek ™, Pall Gelman 2).

**4.3 Máy lắc ngang** (rocker platform).

**4.4 Máy lắc quay**.

**4.5 Bánh xe quay**.

**4.6 Bộ lọc,** 150 ml, ví dụ: Nacheene, Cat số 130-4045 2).

**4.7 Phễu lọc dùng một lần**, 25 mm,ví dụ: Whatman Biosciences 3).

**4.8 Ống Dynal L10** (Prod. số 740-03) 3).

**4.9 Dynal MPC®-1** (Prod. số 120.01) 3), thiết bị tập trung hạt từ tính, có thể gắn các ống có thể tích từ 5 ml đến 50 ml, đường kính từ 10 mm đến 30 mm.

**4.10 Dynal MPC®-S** (Prod. số 120.20) 2), thiết bị tập trung hạt từ tính, có thể gắn các ống có thể tích từ 10 µl đến 2 ml.

**4.11 Bộ chân không**, ví dụ: bộ chân không phòng thí nghiệm Vac-Man® 20 mẫu; Promega.

**4.12 Màng lọc FTA**,ví dụ: Whatman Biosciences 3).

**4.13 Tấm ép ảnh**,ví dụ: Scotch® 3).

**4.14 Ống ly tâm hình nón**, dung tích250 ml.

**4.15 Máy ly tâm lạnh**, ví dụ:Sorvall RT7 Plus [[3]](#footnote-3)).

**4.16 Kính hiển vi huỳnh quang chiếu sáng Epi**, được trang bị khối lọc UV 1A (bộ lọc kích thích EX 365/10); gương lưỡng sắc DM 440; bộ lọc rào cản BA-400; hoặc tương đương.

Quang học cho độ tương phản nhiễu khác biệt (DIC). *Cryptosporidium* spp.: bộ lọc thích hợp để xem các kén hợp tử liên hợp với chất phát tín hiệu huỳnh quang fluorescein isothiocyanate (FITC) (xem Bảng 1).

**4.17 Kính hiển vi thủy tinh** và **nắp trượt**.

**4.18 Giấy thấm.**

**4.19 Thiết bị gia nhiệt**, để ủ ở 56 °C.

**4.20 Máy đục lỗ đơn (đường kính 6 mm).**

**4.21 Ống PCR**, dung **tích 0,65 ml, có thành mỏng (PGC).**

**4.22 Đầu côn pipet ART**, ví dụ: Molecular BioProducts.

**4.23 Thiết bị khuếch đại ADN PTC-200 hoặc thiết bị tương đương về chu kỳ nhiệt.**

**4.24 Thiết bị điện di gel ngang và bộ tích điện.**

**4.25 Máy ảnh Polaroid** hoặc **hệ thống hình ảnh kỹ thuật số**, để chụp gel nhuộm ethidium bromide.

**4.26 Phim Polaroid Type 667.**

**4.27 Máy soi UV** (thiết bị truyền tia UV/ Transilluminator).

**5 Lấy mẫu**

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc không bị thay đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

**6 Cách tiến hành**

**6.1 Chuẩn bị mẫu thử**

**6.1.1 Mẫu dạng lỏng**

Đối với các mẫu dạng lỏng như nước quả, rượu táo và sữa, sử dụng phần mẫu thử từ mẫu đã lấy.

**6.1.2 Mẫu thực phẩm tươi sống**

Đối với các loại rau ăn lá (rau diếp, rau thơm, v.v..), quả mọng (ví dụ như quả mâm xôi) và các thực phẩm tươi sống khác, sử dụng quy trình rửa sau đây để thu lấy phần mẫu thử:

1. Đặt phần mẫu thử (từ 10 g đến 25 g mẫu lá tươi hoặc khoảng 50 g mẫu quả mọng tươi) vào túi lọc BagPage®+ (4.1), thêm 100 ml dH2O (3.1.1) và gắn mép túi bởi dụng cụ kẹp túi (4.1).
2. Đặt túi lọc chứa phần mẫu thử lên máy lắc ngang (4.3) và khuấy nhẹ trong 30 min ở nhiệt độ phòng, đảo ngược túi sau 15 min.
3. Chuyển phần dịch nổi phía trên từ túi lọc vào các ống ly tâm hình nón 50 ml (4.14) sạch và ly tâm trên máy ly tâm lạnh (4.15) trong 20 min với gia tốc 2 000x*g*.

**6.2 Phân lập ký sinh trùng**

**6.2.1 Phân lập ký sinh trùng từ nước rửa các thực phẩm tươi sống**

**6.2.1.1 Phân lập *Cyclospora* từ nước rửa các thực phẩm tươi sống**

1. Hút dịch nổi đã ly tâm (không làm xáo trộn các mảnh vụn) đến thể tích không vượt quá 45 ml khi trộn.
2. Loại bỏ các mảnh vụn trong dịch nổi và trộn.
3. Thêm 2,5 ml bộ đệm NET-BSA chứa Celite 20 % (3.9) (đảm bảo rằng Celite được để yên hoàn toàn trước khi thêm vào mẫu rửa). Trộn các mẫu trên bánh xe quay (4.5) ở nhiệt độ phòng trong 15 min.
4. Thêm 1,0 ml huyền phù PVPP 10 % (3.10). Trộn các mẫu trên bánh xe quay (4.5) ở nhiệt độ phòng trong 15 min.
5. Chuẩn bị bộ lọc 150 ml (4.6) bằng cách loại bỏ màng lọc (0,45 µm hoặc 0,2 µm) nhưng vẫn giữ lại bộ lọc lớp 4. Gắn vào bộ chân không (4.11).
6. Làm ướt bộ lọc bằng một thể tích nhỏ (khoảng 10 ml) đệm NET (3.7).
7. Chuyển dung dịch mẫu thử chứa Celite và PVPP vào bộ lọc 150 ml đã chuẩn bị (có hút chân không). Đảm bảo chất lỏng đi qua vách ngăn lọc để loại bỏ các hạt và các mảnh Celite khỏi huyền phù. Các Celite hấp phụ sẽ ngăn ngừa tắc nghẽn bộ lọc.
8. Rửa bình chứa bằng 10 ml đệm NET (3.7) để thu hồi tối đa phần mẫu chứa Celite còn lại và chuyển vào bộ lọc. Sau đó rửa Celite và hạt trên bộ lọc với 10 ml đệm NET.
9. Trước khi lọc FTA trong bước 6.2.1.1 l), lưu khoảng 10 % mẫu đã lọc để kiểm tra bằng kính hiển vi.
10. Chuẩn bị các bộ phễu lọc chứa màng lọc FTA (4.12) và gắn vào bộ chân không (4.11).
11. Trong điều kiện chân không, làm ướt bộ lọc FTA.
12. Từ từ chuyển dịch lọc từ bước 6.2.2.1 i) vào bộ lọc FTA trong điều kiện chân không cho đến khi toàn bộ mẫu đi qua bộ lọc.
13. Trong khi phễu lọc đang gắn vào bộ chân không, rửa bộ lọc hai lần, mỗi lần 10 ml đệm lọc FTA (3.17) và hai lần, mỗi lần 10 ml dung dịch đệm rửa màng lọc FTA (3.18).
14. Tháo bộ lọc ra khỏi bộ chân không, các chi tiết và đĩa lọc FTA được làm khô trên thiết bị gia nhiệt 56 °C (4.19).

**6.2.1.2** **Phân lập *Cryptosporidium* spp. từ nước rửa các thực phẩm tươi sống**

* 1. Hút dịch nổi đã ly tâm (không làm xáo trộn các mảnh vụn) đến thể tích không vượt quá 10 ml khi trộn.
  2. Loại bỏ các mảnh vụn trong dịch nổi và trộn. Lưu ý thể tích các mảnh vụn không được vượt quá 0,5 ml thể tích xử lý vì thể tích này có ảnh hưởng đến các bước tiếp theo sử dụng sự hấp phụ miễn dịch của kén hợp tử *Cryptosporidium*.
  3. Thực hiện theo hướng dẫn kèm theo Bộ kit Dynabeads kháng *Cryptosporidium* (3.11) để tách từ miễn dịch (IMS) của các kén hợp tử *Cryptosporidium* từ các thực phẩm tươi sống, sử dụng ống theo khuyến cáo và các thiết bị thu từ (4.9 hoặc 4.10).

Rửa giải kén hợp tử *Cryptosporidium* trong 0,1 ml dung dịch axit clohydric 0,1 N (3.13) trong 5 min ở nhiệt độ phòng.

* 1. Trung hòa dung dịch rửa giải axit bằng 0,01 ml dung dịch natri hydroxit 0,1 N (3.14). Lưu giữ khoảng 10 % mẫu để kiểm tra bằng kính hiển vi.
  2. Pha loãng với 10 ml dung dịch đệm NET (3.7).
  3. Tiếp tục theo bước j) đến bước n) nêu trong 6.2.1.1.

**6.2.2 Phân lập các ký sinh trùng gây ô nhiễm từ nước quả, rượu táo và sữa**

**6.2.2.1 Phân lập *Cyclospora* từ nước quả, rượu táo và sữa**

1. Chỉnh pH của 25 ml phần mẫu thử đến pH 8,0.
2. Thêm một thể tích tương đương của đệm NET (3.7) và trộn đều.
3. Tiếp tục theo bước c) đến bước n) nêu trong 6.2.1.1.

**6.2.2.2 Phân lập *Cryptosporidium* spp. từ nước quả, rượu táo và sữa**

Lấy trực tiếp 10 ml phần mẫu thử bằng tách từ tính miễn dịch, sử dụng Bộ kit Dynabeads kháng *Cryptosporidium* (3.11) cùng các ống theo khuyến cáo và các thiết bị thu từ (4.9 hoặc 4.10), theo bước c) đến bước f) nêu trong 6.2.1.2.

**6.2.3 Phân lập ký sinh trùng từ các khối nước có thể tích lớn**

Quy trình này áp dụng để phân lập ký sinh trùng ô nhiễm từ nguồn nước (suối, sông, hồ chứa, nước đọng, dòng chảy, v.v…).

1. Đặt một viên nang lấy mẫu Envirochek™ (4.2) vào nguồn nước cần lấy mẫu. Đảm bảo rằng tốc độ dòng chảy không vượt quá các tiêu chuẩn được thiết lập bởi nhà sản xuất.
2. Thu thập mẫu từ 10 L nước chảy qua.
3. Loại bỏ các chất ô nhiễm được lọc bởi bộ lọc bằng 125 ml dung dịch đệm rửa giải (3.2). Các bộ lọc nên được xử lý bằng dung dịch rửa giải, bịt kín và khuấy trộn trên bánh xe quay (4.5) với tốc độ vừa phải trong ít nhất 5 min đến 10 min theo khuyến nghị của nhà sản xuất. Dịch sau lọc được cho vào ống ly tâm hình nón 250 ml (4.14).
4. Lặp lại bước 6.2.3 c) và kết hợp rửa bộ lọc.
5. Ly tâm mẫu với gia tốc từ 1 500*g* đến 2 000*g* trong 20 min.
6. Tiến hành theo 6.2.1.1 và 6.2.1.2 để phân lập *Cyclospora* và *Cryptosporidium* spp. tương ứng.

**6.3 Chuẩn bị tiêu bản và phân tích trên kính hiển vi**

**6.3.1 Chuẩn bị tiêu bản và phân tích *Cyclospora cayetanensis* trên kính hiển vi**

**6.3.1.1 Khái quát**

Các kén hợp tử *Cyclospora* phát ra ánh sáng tự động màu xanh coban với bộ lọc phát xạ UV-1A hoặc xanh lam với các bộ lọc phổ phát xạ rộng hơn dưới ánh sáng cực tím. Chuẩn bị các tiêu bản trùng lặp và kiểm tra các tiêu bản dưới ánh sáng cực tím như được mô tả dưới đây.

Phòng thử nghiệm cần sử dụng một mặt kính hiển vi có khả năng đo sinh vật trong phạm vi từ 8 µm đến 10 µm để xác định kích thước kén hợp tử khi ký sinh trùng được phục hồi. So sánh các đặc điểm hình thái của các kén hợp tử giả định với các đặc điểm trong một tiêu chuẩn đã biết.

**6.3.1.2 Chuẩn bị tiêu bản**

a) Tiến hành ly tâm khoảng 10 % mẫu đã lọc [bước i) của 6.2.1.1] với gia tốc 1 500 × g trong 10 min đến 15 min ở 4 °C để phân tích dưới kính hiển vi. Để dịch nổi trên mặt của lớp hạt sau ly tâm khoảng 0,5 ml. Sử dụng pipet, nhẹ nhàng làm cho đồng nhất.

b) Sử dụng mỡ chân không silicon (3.3) vào cạnh của nắp trượt kính hiển vi (4.17).

c) Đặt 10 µl huyền phù chứa các mảnh vụn vào một lam kính thủy tinh sạch và chuẩn bị gắn ướt bằng cách sử dụng phiến che được bôi mỡ.

**6.3.1.3 Soi dưới kính hiển vi**

1. Kiểm tra tiêu bản dưới ánh sáng tia UV ở độ phóng đại 400 ×. Kén hợp tử *Cyclospora* tự động phát màu xanh coban. Kiểm tra tiêu bản tại nhiều mặt phẳng dưới tia UV.
2. Chuyển từ kính hiển vi phát quang sang kính hiển vi trường sáng hoặc kính hiển vi tương phản nhiễu khác biệt. Xác định kích thước của bất kỳ kén hợp tử giả định ở độ phóng đại 1 000 lần. So sánh với tiêu bản tiêu chuẩn. Xác nhận cấu trúc bên trong của kén hợp tử *Cyclospora* giả định so với tiêu chuẩn tiêu chuẩn.
3. Gắn nắp trượt vào các lam kính của vật mẫu dương tính giả định bằng sơn móng tay, hợp chất trượt hoặc sáp parafin (3.16).
4. Ghi nhận mẫu dương tính giả định với các hình ảnh được chụp tại nhiều mặt phẳng.

**6.3.2 Chuẩn bị tiêu bản và phân tích *Cryptosporidium* spp. trên kính hiển vi**

Việc kiểm tra phần mẫu thử đã chuẩn bị bằng kính hiển vi để phát hiện kén hợp tử *Cryptosporidium* spp. được tiến hành bằng cách sử dụng bộ kit tách hạt miễn dịch từ tính (IMS) có bán trên thị trường và các chất dán nhãn miễn dịch huỳnh quang.

Lấy khoảng 10 µl dịch lỏng đã tách từ tính miễn dịch, từ bước e của 6.2.1.2, dán nhãn với chất phát huỳnh quang FITC, sử dụng Bộ kit kết hợp hydrofluor đối với *Cryptosporidium* và *Giardia* (3.12) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và kiểm tra theo hướng dẫn của nhà sản xuất kính hiển vi phản quang thông thường và chế độ phát quang (xem Bảng 1).

**Bảng 1 – Các thông số của kính hiển vi phát quang**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ánh sáng tới (nguồn sáng)** | **Bộ lọc kích thích** | **Bộ lọc lưỡng sắc** | **Bộ lọc rào cản** | **Bộ lọc cản màu đỏ** |
| Hơi thủy ngân, công suất 200 W, 100 W hoặc 50 W | KP500 | TK510 | K510 or K530 | BG38 |
| FITC | TK510 | K530 | BG38 |
| Bóng đèn halogen công suất 50 W và 100 W | KP500 | TK510 | K510 or K530 | BG38 |
| FITC | TK510 | K530 | BG38 |

**6.4 Phân tích PCR**

**6.4.1 Khái quát**

Việc phát hiện phân tử của *Cyclospora* spp. và *Cryptosporidium* spp. được thực hiện riêng rẽ bằng tiến hành kỹ thuật chuỗi phản ứng PCR lồng (nested PCR). Việc xác định phân biệt *Cyclospora cayetanensis* với các ký sinh trùng gây bệnh khác ở người (ví dụ: *Eimeria* spp.) sử dụng phép thử PCR đa mồi lồng. Phép thử này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng máy khuếch đại thông thường có nắp được làm nóng hoặc real-time PCR và Roche LightCycler®.

Việc phát hiện *Cryptosporidium* spp. cũng liên quan đến khuếch đại PCR lồng. Tuy nhiên, sự khác biệt và đặc trưng của *Cryptosporidium* spp. yêu cầu phân tích thêm bằng xét nghiệm đa hình đoạn giới hạn đoạn (RFLP).

CHÚ THÍCH: *C. parvum* kiểu gen I đã được đổi tên thành *C. hominis; C. parvum* kiểu gen II (chủng bò) hiện được gọi là *C. parvum.*

**6.4.2 Mồi**

Trình tự mồi ADN cho khuếch đại đặc hiệu *Cyclospora* thu được từ các trình tự gen 18S rARN đã công bố, xem Bảng 2.

**Bảng 2 – Trình tự mồi ADN cho khuếch đại đặc hiệu *Cyclospora***

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tên mồi** | **Ký sinh trùng đích** | **Trình tự mồi (5'-3')** | **Kích thước khuếch đại**, bp | **Kỹ thuật** |
| F1E (mồi xuôi) | *Cyclospora* và *Eimeria* spp. | TACCCAATGAAAACAGTTT | 636 | Khuếch đại sơ cấp |
| R2B (mồi ngược) | CAGGAGAAGCCAAGGTAGG |
| CC719 (mồi xuôi) | *C. cayetanensis* | GTAGCCTTCCGCGCTTCG | 298 | Khuếch đại lồng |
| PLDC661 (mồi xuôi) | *C. cercopitheci, C. colobi, C. papionis* | CTGTCGTGGTCATCGTCCGC | 361 | Khuếch đại lồng |
| ESSP841 (mồi xuôi) | *Eimeria* spp. | GTTCTATTTTGTTGGTTTCTAGGACCA | 174 | Khuếch đại lồng |
| CRP999 (mồi ngược) | *Cyclospora* và *Eimeria* spp. | CGTCTTCAAACCCCCTACTGTCG |  | Khuếch đại lồng |

Trình tự mồi ADN cho khuếch đại đặc hiệu *Cryptosporidium* thu được từ các trình tự gen 18S rARN đã công bố, xem Bảng 3.

**Bảng 3 – Trình tự mồi ADN cho khuếch đại đặc hiệu với chi *Cryptosporidium***

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tên mồi** | **Ký sinh trùng đích** | **Trình tự mồi (5'-3')** | **Kích thước khuếch đại**, bp | **Kỹ thuật** |
| ExCry1 (mồi xuôi) | *Cryptosporidium* spp. | GCCAGTAGTCATATGCTTGTCTC | 844 | Khuếch đại sơ cấp |
| ExCry2 (mồi ngược) | *Cryptosporidium* spp. | ACTGTTAAATAGAAATGCCCCC | 844 | Khuếch đại sơ cấp |
| NesCry3 (mồi xuôi) | *Cryptosporidium* spp. | GCGAAAAAACTCGACTTTATGGAAGGG | 590-593 | Khuếch đại lồng |
| NesCry4 (mồi ngược) | *Cryptosporidium* spp. | GGAGTATTCAAGGCATATGCCTGC | 590-593 | Khuếch đại lồng |

**6.4.3 Chuẩn bị mẫu cho khuếch đại PCR sơ cấp**

1. Bấm 3 vùng đã được đánh dấu (đường kính 6 mm) từ đĩa lọc FTA khô (xem 6.2) bằng cách sử dụng một máy đục lỗ (4.20) duy nhất. Việc khử nhiễm đối với máy đục lỗ là không cần thiết vì ô nhiễm chéo giữa các mẫu từ máy đục lỗ là không đáng kể. Tuy nhiên, có thể làm sạch bằng etanol giữa các đĩa mẫu nếu thấy phù hợp.
2. Chèn các bộ lọc đã đục lỗ vào đáy của các ống PCR 0,65 ml có thành mỏng (4.21).
3. Phân phối 50 µl Master Mix HotStartTaq™ (3.20) vào mỗi ống PCR.
4. Chuẩn bị hỗn hợp thuốc thử chính (xem Bảng 4) với các đoạn mồi ADN xuôi và ngược (xem Bảng 2 và Bảng 3) và phân phối vào mỗi ống PCR.
5. Tất cả các phân tích PCR phải bao gồm các kiểm chứng dương và kiểm chứng âm (xem Bảng 5).
6. Trộn ống nhẹ nhàng.

Thực hiện chu trình nhiệt thích hợp (Bảng 6 và Bảng 7) để khuếch đại PCR sơ cấp.

**Bảng 4 – Các điều kiện PCR thông thường cho khuếch đại PCR sơ cấp**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Thành phần** | | **Thể tích a)**, µl | **Nồng độ cuối cùng** |
| Đĩa lọc FTA (DNA Template) | |  |  |
| Master Mix HotStartTaq™ | | 50,0 | b) |
| Master Mix | MgCl2, 25 mM | 2,0 | 2,0 mM c) |
| Mồi xuôi, 10 µM | 2,0 | 0,2 µM |
| Mồi ngược, 10 µM | 2,0 | 0,2 µM |
| Nước khử ion vô trùng | 44,00 |  |
| **a)** Tổng thể tích là 100 µl.  b) Nồng độ cuối cùng của các thành phần trong Master Mix HotStartTaq™ là: mỗi dNTP 200 µM, MgCl2 1,5 mM và ADN Polymerase HotStarTaq™ 2,5 U.  c) Nồng độ cuối cùng của MgCl2 từ Master Mix HotStartTaq™ và dung dịch gốc MgCl2 25 mM. | | | |

**Bảng 5 – Các kiểm chứng đối với quá trình khuếch đại PCR**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Kiểu kiểm chứng** | | **Điều kiện/ Loại ký sinh trùng** |
| Kiểm chứng âm 1 | | Mẫu trắng thuốc thử, không có bộ lọc |
| Kiểm chứng âm 2 | | Mẫu trắng thuốc thử, không gây nhiễm, có lọc rửa |
| Kiểm chứng dươnga) | Phân tích *Cyclospora* | *C. cayetanensis* |
| *Cyclospora* spp. (từ động vật linh trưởng không phải là con người) b) |
| *Eimeria* spp. |
| Phân tích *Cryptosporidium* | *C. hominis* (trước đây là *C. parvum* genotype I) b) |
| *C. parvum*, (trước đây là *C. parvum* genotype II (chủng bò) |
| *C. baileyi* b) |
| *C. serpentis* b) |
| a) Nếu có thể, kiểm chứng dương với các bộ lọc FTA nên được gây nhiễm với ít nhất 103 ký sinh trùng.  b)  Không thường xuyên có sẵn. | | |

**Bảng 6 – Chu trình nhiệt PCR đối với *Cyclospora* và *Eimeria* spp.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Các bước** | **Số lượng chu trình** | **Nhiệt độ và thời gian** |
| **PCR sơ cấp** | Kích hoạt ban đầu | 1 | 95 °C; 15 min |
| Khuếch đại | 35 | Biến tính: 94 °C; 30 s |
| Gắn mồi: 53 °C; 30 s |
| Kéo dài: 72 °C; 90 s |
| Kéo dài cuối cùng | 1 | 72 °C; 10 min |
| **PCR đa mồi lồng a)** | Kích hoạt ban đầu | 1 | 95 °C; 15 min |
| Khuếch đại | 25 | Biến tính: 94 °C; 15 s |
| Gắn mồi: 66 °C; 15 s |
| a) Đây là một chương trình khuếch đại 2 bước nghiêm ngặt (ủ đồng thời và mở rộng ở 66 °C). Hơn nữa, quy trình này không yêu cầu bước kéo dài cuối cùng. | | | |

**Bảng 7 –** **Chu trình nhiệt PCR đối với *Cryptosporidium* spp.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Các bước** | **Số lượng chu trình** | **Nhiệt độ và thời gian** |
| **PCR sơ cấp** | Kích hoạt ban đầu | 1 |  |
| Khuếch đại | 40 | Biến tính: 94 °C; 45 s |
| Gắn mồi: 53 °C; 75 s |
| Kéo dài: 72 °C; 45 s |
| Kéo dài cuối cùng | 1 | 72 °C; 7 min |
| **PCR lồng** | Kích hoạt ban đầu | 1 | 95 °C; 15 min |
| Khuếch đại | 35 | Biến tính: 94 °C; 25 s |
| Gắn mồi: 65 °C; 25 s |
| Kéo dài: 72 °C; 25 s |
| Kéo dài cuối cùng | 1 | 72 °C; 7 min |

**6.4.4 Khuếch đại PCR đa mồi lồng thông thường để phân biệt *Cyclospora* và *Eimeria* spp.**

1. Phân phối 25 µl Master Mix HotStartTaq™ (3.20) vào mỗi ống PCR.
2. Chuẩn bị hỗn hợp thuốc thử chính (xem Bảng 8) và phân phối vào tất cả các ống.
3. Hoàn thành phản ứng chạy mẫu với việc bổ sung thể tích mong muốn dung dịch khuếch đại sơ cấp (từ 1 µl đến 3 µl).
4. Đảm bảo các mẫu kiểm chứng âm và kiểm chứng dương đều được thực hiện trong các phản ứng khuếch đại sơ cấp.
5. Trộn ống nhẹ nhàng.
6. Thực hiện theo chu trình nhiệt thích hợp được nêu trong Bảng 6.

**Bảng 8 – Thành phần phản ứng kỹ thuật PCR đa mồi lồng thông thường đối với *Cyclospora* and *Eimeria* spp.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Thành phần** | **Thể tích a)**, µl | **Nồng độ cuối cùng** |
| Master Mix HotStartTaq™ | 25,0 | b) |
| MgCl2, 25 mM | 1,0 | 2,0 mM c) |
| CC719 (mồi xuôi), 10 µM | 1,0 | 0,2 µM |
| PDCL661 (mồi xuôi), 10 µM | 1,0 | 0,2 µM |
| ESSP841 (mồi xuôi), 10 µM | 1,0 | 0,2 µM |
| CRP999 (mồi ngược), 10 µM | 1,0 | 0,2 µM |
| Nước khử ion vô trùng | 19,00 |  |
| ADN mẫu (sản phẩm khuếch đại sơ cấp) | 1,0 |  |
| **a)** Tổng thể tích là 50 µl.  b) Nồng độ cuối cùng của các thành phần trong Master Mix HotStartTaq™ là: mỗi dNTP 200 µM, MgCl2 1,5 mM và ADN Polymerase HotStarTaq™ 2,5 U.  c) Nồng độ cuối cùng của MgCl2 từ Master Mix HotStartTaq™ và dung dịch gốc MgCl2 25 mM. | | |

**6.4.5 Khuếch đại Real-time PCR đa mồi để phân biệt *Cyclospora* và *Eimeria* spp. sử dụng hệ Roche LightCycler® (tùy chọn)**

1. Đặt số lượng mao quản thủy tinh cần thiết vào khối làm lạnh được làm lạnh trước (có bộ chuyển đổi thể tích ly tâm đi kèm máy ly tâm).
2. Chuẩn bị hỗn hợp thuốc thử chính (Bảng 9) và phân phối vào các ống PCR 0,65 ml (4.21) riêng lẻ.
3. Hoàn thành phản ứng chạy mẫu với việc bổ sung 1 µl dung dịch khuếch đại sơ cấp.
4. Đảm bảo các mẫu kiểm chứng âm và kiểm chứng dương đều được thực hiện trong các phản ứng khuếch đại sơ cấp.
5. Trộn ống nhẹ nhàng.
6. Phân phối hỗn hợp phản ứng vào các mao quản thủy tinh, nút ống và ly tâm trong thời gian ngắn (từ 5 s đến 10 s với tốc độ 3 000 r/min) trong một máy ly tâm siêu nhỏ.
7. Chuyển mao quản thủy tinh sang băng chuyền LightCycler®.

Thực hiện theo chu trình nhiệt thích hợp được nêu trong Bảng 10.

1. Xác nhận thời gian thực về ký sinh trùng gây bệnh có thể được thực hiện bằng cách phân tích đường cong tan chảy (xem Bảng 11).
2. Để xác nhận cuối cùng, các mẫu có thể được phục hồi từ mỗi mao quản thủy tinh.
3. Mở nút, chuyển mao quản vào ống PCR 0,65 ml chứa 5 µl dung dịch nạp mẫu (3.24) và ly tâm trong thời gian ngắn (từ 5 s đến 10 s với tốc độ 3 000 r/min) trong một máy ly tâm siêu nhỏ.
4. Điện di trên gel agarose theo các bước từ bước b) đến bước f) của 6.4.7.

**Bảng 9 – Thành phần phản ứng Real-time PCR đa mồi lồng đối với *Cyclospora* và *Eimeria* spp*.***

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Thành phần** | **Thể tích a)**, µl | **Nồng độ cuối cùng** |
| LightCycler®-FastStart DNA Master SYBR Green | 2,0 | - |
| MgCl2, 25 mM | 1,.6 | 3,0 Mm |
| CC719 (Mồi xuôi), 10 µM | 1,0 | 0,5 µM |
| PDCL661 (Mồi xuôi), 10 µM | 1,0 | 0,5 µM |
| ESSP841 (Mồi xuôi), 10 µM | 1,0 | 0,5 µM |
| CRP999 (Mồi ngược), 10 µM | 1,0 | 0,5 µM |
| Nước khử ion vô trùng | 11,40 | - |
| Mẫu ADN (sản phẩm khuếch đại sơ cấp) | 1,0 | - |
| a) Tổng thể tích 20 µl. | | |

**Bảng 10 – Chu trình nhiệt phản ứng Real-timePCR đa mồi đối với *Cyclospora* và *Eimeria* spp.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Các bước** | **Số lượng chu kỳ** | **Nhiệt độ và thời gian** | **Lưu ý** |
| Kích hoạt enzym | 1 | 95 °C; 10 min |  |
| Khuếch đại | 30 | Biến tính: 95 °C; 15 s |  |
| Gắn mồi: 66 °C; 15 s | Thu nhận huỳnh quang đơn |
| Phân tích đường cong tan chảy | 1 | 95 °C; 15 s |  |
| 65 °C; 15 s |  |
| 98 °C; 0,1 °C/s | Thu nhận huỳnh quang liên tục |

**Bảng 11 – Các kết quả mong đợi của phản ứng Real-time PCR đa mồi**

**đối với *Cyclospora* và *Eimeria* spp. bởi phân tích đường cong tan chảy**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tên mồi** | **Ký sinh trùng đích** | **Trình tự mồi (5'-3')** | **Kích thước khuếch đại**, bp | **Nhiệt độ khuếch đại**, °C |
| CC719 | *C. cayetanensis* | GTAGCCTTCCGCGCTTCG | 298 | 85 °C |
| PLDC661 | *C. cercopitheci, C. colobi, C. papionis* | CTGTCGTGGTCATCGTCCGC | 361 | 91 °C |
| ESSP841 | *Eimeria* spp. | GTTCTATTTTGTTGGTTTCTAGGACCA | 174 | 81 °C |

**6.4.6 Khuếch đại PCR lồng để xác định sự khác biệt của *Cryptosporidium* spp.**

* 1. Phân phối 25 µl Master Mix HotStartTaq™ (3.20) vào mỗi ống PCR.
  2. Chuẩn bị hỗn hợp thuốc thử chính (xem Bảng 12) và phân phối vào tất cả các ống.
  3. Hoàn thành phản ứng chạy mẫu với việc bổ sung thể tích mong muốn dung dịch khuếch đại sơ cấp (từ 1 µl đến 3 µl).
  4. Đảm bảo các mẫu kiểm chứng âm và kiểm chứng dương đều được thực hiện trong các phản ứng khuếch đại sơ cấp.
  5. Trộn ống nhẹ nhàng.
  6. Thực hiện theo chu trình nhiệt thích hợp được nêu trong Bảng 7.

**Bảng 12 – Thành phần phản ứng PCR lồng đối với *Cryptosporidium* spp.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Thành phần** | **Thể tích a)**, µl | **Nồng độ cuối cùng** |
| HotStartTaq™ Master Mix | 25,0 | b) |
| MgCl2, 25 mM | 1,0 | 2,0 mM c) |
| NesCry3 (mồi xuôi), 10 µM | 1,0 | 0,2 µM |
| NesCry4 (mồi ngược), 10 µM | 1,0 | 0,2 µM |
| Nước khử ion vô trùng | 21,0 |  |
| ADN mẫu (sản phẩm khuếch đại sơ cấp) | 1,0 |  |
| **a)** Tổng thể tích là 50 µl.  b) Nồng độ cuối cùng của các thành phần trong Master Mix HotStartTaq™ là: mỗi dNTP 200 µM, MgCl2 1,5 mM và ADN Polymerase HotStarTaq™ 2,5 U.  c) Nồng độ cuối cùng của MgCl2 từ Master Mix HotStartTaq™ và dung dịch gốc MgCl2 25 mM. | | |

**6.4.7 Điện di gel agarose**

1. Trộn 10 µl sản phẩm PCR khuếch đại lồng với từ 2 µl đến 3 µl dung dịch nạp mẫu (3.24).
2. Cho mẫu vào giếng của gel agarose 1,5 % được chuẩn bị bằng đệm 0,5x TAE (3.21) chứa ethidium bromide (3.23) 0,2 µg/ml. Bao gồm ít nhất một giếng chứa thang ADN 100 bp (3.25) để xấp xỉ kích thước của bất kỳ khuếch đại nào hiện diện trên bản gel.
3. Chạy gel ở điện áp không đổi 125 V trong ít nhất 30 min.
4. Các sản phẩm PCR trên gel agarose có thể được nhìn thấy bằng cách sử dụng thiết bị truyền tia UV (4.27). Chụp ảnh gel ghi nhận kết quả thử nghiệm bằng phim Polaroid Type 667 (4.26) (hoặc hệ thống kỹ thuật số, nếu cần).
5. Các khuếch đại chính từ cặp mồi F1E/R2B đối với phản ứng PCR *Cyclospora* có thể không nhìn thấy được; do đó, chỉ nên điện di sản phẩm từ phản ứng PCR lồng.
6. Kích thước dự đoán của các bộ khuếch đại PCR từ *Cyclospora* spp., *Eimeria* spp. và *Cryptosporidium* spp. được nêu trong Bảng 1 và Bảng 2.

**6.4.8 Giới hạn phân đoạn độ dài đa hình (RFLP) của các sản phẩm khuếch đại PCR lồng nhau *Cryptosporidium* spp. để xác định sự có mặt của kén hợp tử *C. parvum* và phân biệt *C. hominis* với *C. parvum***

Sản phẩm 590 bp (kiểu gen I) hoặc sản phẩm 593 bp (kiểu gen II) sau PCR lồng là kết quả dương tính với sự có mặtcủa *Cryptosporidium* spp.

Các mẫu hạn chế do sự phân giải của sản phẩm phản ứng khuếch đại lồng với enzyme giới hạn VspI (3.26) và DraII (3.27) sẽ phân biệt giữa *C. parvum* với *C. hominis* (phân giải VspI) và giữa *C. parvum* với *C. baileyi* và *C. sepentis* (phân giải DraII).

1. Kết hợp 15 µl sản phẩm khuếch đại của phản ứng khuếch đại PCR lồng *Cryptosporidium* với VspI, 2,0 µl của bộ đệm enzym 10x và 0,2 µl dung dịch BSA (bao gồm cả enzym). Điều chỉnh thể tích cuối cùng thành 20 µl với dH2O vô trùng.
2. Để phân giải DraII, kết hợp 15 µl sản phẩm khuếch đại của phản ứng khuếch đại PCR lồng *Cryptosporidium* với một đơn vị DraII, 2,0 µl của đệm enzym 10x, và điều chỉnh thể tích cuối cùng thành 20 µl.
3. Các mẫu kiểm chứng dương đối với *C. parvum* và các loài *Cryptosporidium* khác phải được phân giải theo cách tương tự và cùng với các mẫu thử nghiệm.
4. Ủ mẫu phân giải trong ít nhất 2 h ở 37 °C.
5. Phân tích mẫu bằng phương pháp điện di trên gel, sử dụng gel NuSieve 3 % (3.26) được chuẩn bị bằng 0,5x TAE và ethidium bromide 0,2 %.
6. Trộn từ 10 µl đến 15 µl sản phẩm khuếch đại lồng với từ 2 µl đến 3 µl dung dịch nạp gel (3.24) và nạp vào giếng gel. Bao gồm ít nhất một làn chứa ADN thang 25 bp (3.25) để ước tính kích thước của các đoạn giới hạn có mặt.
7. Chạy gel ở điện áp không đổi 125 V trong ít nhất 45 min.
8. Các mẫu RFLP có thể được nhìn thấy trên gel agarose bằng cách sử dụng thiết bị truyền tia UV (4.27). Chụp ảnh gel để ghi nhận kết quả thử nghiệm bằng phim Polaroid Type 667 (4.26) (hoặc hệ thống kỹ thuật số, nếu cần).
9. Độ dài đoạn sản phẩm khuếch đại PCR trên gel dự đoán xác nhận cho sự có mặt của *Cryptosporidium* spp. được nêu trong Bảng 13.

**Bảng 13 –** **Đánh giá phản ứng khuếch đại PCR lồng và RFLP để phân biệt *Cryptosporidium* spp.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ký sinh trùng** | **Khuếch đại PCR** | | **Sản phẩm phân giải RFLP**, bp | |
| **Sơ cấp**, bp | **Lồng**, bp | ***VspI*** | ***DraII*** |
| *C. hominis* (trước đây là *C. parvum*, kiểu gen I) | 844 | 593 | 503 và 90 | - |
| *C. parvum*(trước đây là *C. parvum*, kiểu gen II) | 840 | 590 | - | - |
| *C. baileyi* | 831 | 579 | - | 295 và 284 a) |
| *C. serpentis* | 836 | 583 | - | 298 và 284 a) |
| *C. muiris* | - | - | - | - |
| *C. wrairii* | - | - | - | - |
| a) Không thể phân biệt trong cùng một bản gel agarose. | | | | |

**7 Biểu thị kết quả**

Dựa vào kết quả phân tích trên kính hiển vi và kết quả PCR, nêu kết quả như sau:

a) số lượng kén hợp tử *Cyclospora* và *Cryptosporidium* phát hiện được trên khối lượng mẫu được phân tích, hoặc:

b) "không phát hiện" trên khối lượng mẫu được phân tích, nếu không phát hiện được kén hợp tử *Cyclospora* và *Cryptosporidium*.

**8 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau:

1. phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
2. phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
3. tất cả các chi tiết cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
4. ngày lấy mẫu và khối lượng mẫu đã lấy;
5. ngày phòng thử nghiệm nhận được mẫu;
6. ngày bắt đầu phân tích, khối lượng mẫu phân tích và ngày kết thúc phân tích;
7. mọi thao tác không nêu trong tiêu chuẩn này hoặc được coi là tùy chọn, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
8. số lượng kén hợp tử *Cyclospora* và *Cryptosporidium* phát hiện được và bất kỳ chi tiết có liên quan đến việc nhận dạng và xác nhận kén hợp tử, hoặc sự không có mặt của *Cyclospora* và *Cryptosporidium*, nếu không phát hiện được.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

1. ) Đây là ví dụ về sản phẩm thương mại sẵn có và thích hợp. Thông tin này nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm nêu trên. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương. [↑](#footnote-ref-1)
2. ) Đây là ví dụ về sản phẩm thương mại sẵn có và thích hợp. Thông tin này nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm nêu trên. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương. [↑](#footnote-ref-2)
3. ) Đây là ví dụ về sản phẩm thương mại sẵn có và thích hợp. Thông tin này nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm nêu trên. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương. [↑](#footnote-ref-3)