

**TCVN 10783-1:2015
ISO/TS 15216-1:2013**

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI –
XÁC ĐỊNH VIRUS VIÊM GAN A VÀ NOROVIRUS
TRONG THỰC PHẨM SỬ DỤNG PHẢN ỨNG CHUỖI
POLYMERASE PHIÊN MÃ NGƯỢC THỜI GIAN THỰC –
PHẦN 1: PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG**

*Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for
determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR –
Part 1: Method for quantification*

Lời nói đầu

TCVN 10783-1:2015 hoàn toàn tương đương với ISO/TS 15216-1:2013;

TCVN 10783-1:2015 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 10783 (ISO/TS 15216), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Xác định virus viêm gan A và norovirus trong thực phẩm sử dụng phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược thời gian thực* gồm các phần sau đây:

- TCVN 10783-1:2015 (ISO/TS 15216-1:2013), *Phần 1: Phương pháp định lượng*;
- TCVN 10783-2:2015 (ISO/TS 15216-2:2013), *Phần 2: Phương pháp phát hiện định tính*.

Lời giới thiệu

Virus viêm gan A (HAV) và norovirus (NoV) là các tác nhân chính gây ngộ độc thực phẩm cho người. Chưa có phương pháp thông thường để nuôi cấy các virus này từ nền mẫu thực phẩm. Do đó, việc phát hiện phải dựa trên phương pháp phân tử, sử dụng phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược (RT-PCR). Vì nhiều nền thực phẩm chứa chất gây ức chế phản ứng RT-PCR, nên cần sử dụng phương pháp tách chiết để thu được ARN tinh sạch cao phù hợp với mục đích sử dụng. Đối với bề mặt thực phẩm, loại bỏ virus bằng cách dùng gạc lau. Đối với quả mềm và rau salad, tách chiết virus bằng cách rửa giải đồng thời khuấy trộn sau đó cho kết tủa với PEG/NaCl. Đối với nước đóng chai, hấp thụ và rửa giải sử dụng màng lọc tích điện sau đó cô đặc bằng bộ lọc màng cực tím và đối với động vật nhuyễn thể hai mảnh vỏ, thì tách chiết virus ra khỏi các mô của tuyến tiêu hóa có xử lý bằng dung dịch proteinase K. Đối với tất cả các nền mẫu không đề cập trong tiêu chuẩn này, cần phải đánh giá xác nhận lại phương pháp này. Tất cả các nền mẫu sử dụng cùng một phương pháp tách chiết ARN thường dựa trên capsid virus phân rã với thuốc thử chaotropic, sau đó hấp thụ ARN từ các hạt silica. Kiểm soát quá trình phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược thời gian thực (real-time RT-PCR) khuếch đại qua chuỗi PCR bằng cách đo độ kích thích của phân tử được đánh dấu huỳnh quang. Trong phép phân tích real-time RT-PCR phát huỳnh quang 5' nuclease, các chất đánh dấu huỳnh quang được gắn vào mẫu dò nucleotid có trình tự đặc hiệu (mẫu dò thủy phân) cũng có thể nhận biết đồng thời với khuôn mẫu đích. Sự cải biến này làm tăng độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp PCR và cần phòng ngừa đối với các bước nhận biết sản phẩm khuếch đại tiếp sau phản ứng PCR. Vì sự phức tạp của phương pháp, nên cần có một bộ kiểm soát toàn diện. Phương pháp mô tả trong tiêu chuẩn này có thể phát hiện định tính ARN virus trong mẫu thử. Sơ đồ của quy trình thử nghiệm được nêu trong Phụ lục A.

Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp xác định virus viêm gan A và norovirus trong thực phẩm sử dụng phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược thời gian thực – Phần 1: Phương pháp định lượng

Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR – Part 1: Method for quantification

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng các mức HAV và NoV có ARN nhóm gen I (GI) và NoV có ARN nhóm gen II (GII), từ mẫu thử thực phẩm hoặc bề mặt thực phẩm. Sau khi virus giải phóng ra khỏi mẫu thử, ARN virus được tách chiết bằng cách phân giải trong guanidin thiocyanat và hấp phụ trên cột silica. Trình tự đích trong ARN virus được khuếch đại và phát hiện bằng real-time RT-PCR.

Tiêu chuẩn này cũng dùng để phát hiện virus đích trên vật truyền bệnh hoặc phát hiện virus khác gây bệnh cho người có trong thực phẩm, trên bề mặt thực phẩm hoặc trên vật truyền bệnh, sau khi được đánh giá xác nhận thích hợp và sử dụng môi đích đặc hiệu và các bộ mẫu dò.

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).

ISO 22174, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase để phát hiện sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Yêu cầu chung và định nghĩa)*.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa nêu trong ISO 22174 và các thuật ngữ, định nghĩa sau:

3.1

Thực phẩm (foodstuff)

Chất được sử dụng hoặc được chuẩn bị để dùng làm thực phẩm.

CHÚ THÍCH 1: Trong tiêu chuẩn này, định nghĩa này bao gồm cả nước uống đóng chai.

3.2

Bề mặt thực phẩm (food surface)

Bề mặt của thực phẩm, bề mặt chuẩn bị hoặc bề mặt tiếp xúc với thực phẩm.

3.3

Vật truyền bệnh (fomite)

Thực thể vô sinh hoặc vật liệu là tác nhân lây truyền bệnh.

3.4

Virus viêm gan A (hepatitis A virus)

HAV

Virus thuộc họ *Picornaviridae* gây bệnh viêm gan.

CHÚ THÍCH 1: Nhìn chung, HAV có thể chia thành sáu kiểu gen dựa trên vùng VP1/2A (kiểu gen 1, 2, và 3 đã được tìm thấy trên người, trong khi kiểu gen 4, 5 và 6 có nguồn gốc từ khỉ). Đây chỉ là một kiểu huyết thanh.

CHÚ THÍCH 2: Sự lây truyền xuất hiện theo đường phân-miệng do tiếp xúc từ người sang người, qua việc ăn phải thực phẩm bị nhiễm bẩn, do tiếp xúc với nước hoặc bề mặt thực phẩm bị nhiễm bẩn hoặc tiếp xúc với vật truyền bệnh nhiễm bẩn. Virus hepatitis A được phân thành tác nhân sinh học nhóm 2 theo hiệp hội Châu Âu và nhóm nguy cơ 2 tác nhân gây bệnh theo Bộ y tế của Mỹ.

3.5

Norovirus (norovirus)

Virus thuộc họ *Caliciviridae* gây ra bệnh viêm dạ dày-ruột cấp tính không thường xuyên.

CHÚ THÍCH 1: Nhìn chung, norovirus có thể chia thành năm nhóm gen riêng rẽ.

CHÚ THÍCH 2: Ba nhóm gen GI, GII và GIV đã được đề cập trong sinh bệnh học gây bệnh cho người. Nhóm gen GI và GII gây ra phần lớn các trường hợp lâm sàng. Sự lây truyền xuất hiện theo đường phân-miệng do tiếp xúc từ người sang người, qua sự tiêu hóa thực phẩm bị nhiễm hoặc qua sự tiếp xúc với nước hoặc bề mặt thực phẩm bị nhiễm bẩn hoặc tiếp xúc với vật truyền bệnh. Các norovirus nhóm gen I và các norovirus nhóm gen II phân thành tác nhân sinh học nhóm 2 theo hiệp hội Châu Âu và nhóm nguy cơ 2 gây bệnh theo Bộ y tế của Mỹ.

3.6**Định lượng virus viêm gan A** (quantification of hepatitis A virus)

Ước tính số lượng bản sao ARN của HAV trong một lượng hoặc một thể tích thực phẩm hoặc trên một diện tích bề mặt thực phẩm xác định.

3.7**Định lượng norovirus** (quantification of norovirus)

Ước tính số lượng bản sao ARN của norovirus trong một lượng hoặc một thể tích thực phẩm hoặc trên một diện tích bề mặt thực phẩm xác định.

3.8**Virus kiểm soát quá trình** (process control virus)

Virus được cho vào phần mẫu thử ở thời điểm sớm nhất trước khi tách chiết virus để kiểm soát hiệu quả của quá trình chiết.

3.9**ARN của virus kiểm soát quá trình** (process control virus RNA)

ARN giải phóng khỏi virus kiểm soát quá trình để tạo dữ liệu đường chuẩn khi ước tính hiệu quả của quá trình chiết.

3.10**Kiểm soát quá trình chiết ARN âm tính** (negative RNA extraction control)

Kiểm soát sự giải phóng ARN đích qua tất cả các bước tách chiết ARN và quy trình phát hiện để đánh giá mọi sự nhiễm bẩn chéo.

3.11**Kiểm soát quá trình âm tính** (negative process control)

Mẫu nền thực phẩm không chứa vi sinh vật đích gây bệnh được chạy xuyên suốt mọi giai đoạn của quy trình phân tích.

3.12**Mẫu dò thủy phân** (hydrolysis probe)

Mẫu dò huỳnh quang được kết cặp với hai phân tử huỳnh quang được tách vô trùng bằng hoạt tính enzym của 5'-3'-exonuclease trong suốt quá trình khuếch đại.

3.13**Kiểm soát RT-PCR âm tính** (negative RT-PCR control)

Một lượng nước có độ tinh khiết cao được sử dụng trong phản ứng real-time RT-PCR để kiểm soát sự nhiễm bẩn thuốc thử dùng trong real-time RT-PCR.

3.14

ARN kiểm soát bên ngoài (external control RNA)

ARN đối chứng có thể được dùng làm đích đối với phép phân tích real-time RT-PCR, ví dụ ARN được tái tổng hợp bằng phiên mã *in-vitro* từ plasmid mang bản sao của gen đích, được thêm vào dung dịch lỏng của ARN mẫu với một lượng xác định, để kiểm soát khuếch đại trong phản ứng tách chiết.

3.15

Giá trị C_q (C_q value)

Chu trình định lượng; chu trình PCR mà tại đó gen đích được định lượng trong phản ứng real-time PCR đã cho.

CHÚ THÍCH 1: Giá trị này tương ứng với điểm mà phản ứng huỳnh quang vượt quá ngưỡng.

3.16

Giới hạn phát hiện lý thuyết (theoretical limit of detection)

tLOD

Mức có lượng vi sinh vật đích nhỏ nhất có thể được phát hiện theo lý thuyết.

CHÚ THÍCH: Mức này tương ứng với một bản sao hệ gen trong một thể tích ARN được thử nghiệm trong phản ứng đích, nhưng thay đổi theo nền mẫu thử và số lượng của vật liệu khởi động.

3.17

Giới hạn phát hiện thực tế (practical limit of detection)

pLOD

Nồng độ gen đích thấp nhất trong mẫu thử có thể được phát hiện tái lập (độ tin cậy 95 %) trong các điều kiện thực nghiệm quy định trong phương pháp, được chứng minh bằng phép thử cộng tác hoặc đánh giá xác nhận khác.

CHÚ THÍCH: pLOD liên quan đến phần mẫu thử, chất lượng hoặc số lượng ARN khuôn mẫu và tLOD của phương pháp.

3.18

Giới hạn định lượng (limit of quantification)

LOQ

Nồng độ gen đích thấp nhất trong mẫu thử có thể xác định được bằng cách định lượng với độ chụm và độ chính xác có thể chấp nhận được, trong các điều kiện thực nghiệm quy định của phương pháp, được chứng minh bằng phép thử cộng tác hoặc phép đánh giá xác nhận khác.

CHÚ THÍCH: LOQ liên quan đến phần mẫu thử và định tính hoặc định lượng của ARN khuôn.

4 Nguyên tắc

4.1 Tách chiết virus

Các thực phẩm và bề mặt thực phẩm đề cập trong tiêu chuẩn này thường là các nền mẫu rất phức tạp và có thể có virus đích ở nồng độ thấp. Do đó, cần tiến hành tách chiết và/hoặc cô đặc virus nền-đặc hiệu để thu được cơ chất cho quá trình tiếp theo. Việc lựa chọn phương pháp phụ thuộc vào nền mẫu.

4.2 Tách chiết ARN

Cần sử dụng phương pháp tách chiết ARN sao cho thu được các ARN sạch để giảm ảnh hưởng của chất ức chế PCR. Trong tiêu chuẩn này, sử dụng thuốc thử chaotropic guanidin thiocyanat để phá vỡ vỏ capsid của virus. ARN sau đó được hấp thụ vào silica để tham gia vào quá trình tinh sạch qua vài giai đoạn rửa. ARN của virus đã tinh sạch được giải phóng ra khỏi silica vào chất đệm trước khi tiến hành phản ứng real-time RT-PCR.

4.3 Phản ứng real-time RT-PCR

Trong tiêu chuẩn này sử dụng phản ứng real-time RT-PCR một bước dùng các mẫu dò thủy phân. Trong phản ứng real-time RT-PCR một bước, phiên mã ngược và khuếch đại PCR được tiến hành liên tiếp trong cùng một ống.

Trong phản ứng real-time PCR sử dụng các mẫu dò thủy phân với mẫu dò ADN ngắn có chất đánh dấu huỳnh quang và chất hấp thụ huỳnh quang được gắn ở các đầu đối diện. Phép thử hóa học cần đảm bảo việc tăng số lượng của sản phẩm khuếch đại, bề gãy mẫu dò và tín hiệu huỳnh quang từ chất đánh dấu tăng tương ứng. Có thể đo được huỳnh quang ở từng giai đoạn trong chu trình. Điểm đầu tiên trong chu trình PCR mà tại đó có thể phát hiện được sự khuếch đại đối với mỗi phản ứng là tỷ lệ với số lượng khuôn mẫu, do đó, việc phân tích đồ thị huỳnh quang có thể xác định được số lượng trình tự gen đích có trong mẫu.

Do mức khuôn mẫu virus thường có trong thực phẩm thấp và tính đa dạng của virus đích nên việc chọn thuốc thử real-time RT-PCR một bước, các môi PCR và các mẫu dò thủy phân thích hợp đối với virus đích là rất quan trọng. Các hướng dẫn lựa chọn thuốc thử, môi và mẫu dò được nêu trong 5.2.17 và 5.2.18. Chi tiết về thuốc thử, môi thử và mẫu dò nêu trong Phụ lục B và Phụ lục C.

4.4 Các vật liệu kiểm soát

4.4.1 Virus kiểm soát quá trình

Có thể có hao hụt virus đích ở một vài giai đoạn trong quá trình tách chiết virus mẫu và tách chiết ARN. Để kiểm soát sự hao hụt này, trước khi tiến hành mẫu được thêm chuẩn với lượng xác định virus kiểm soát quá trình. Mức thu hồi virus kiểm soát quá trình phải được xác định cho từng mẫu.

TCVN 10783-1:2015

Virus được chọn để kiểm soát quá trình phải là virus mang ARN thử nghiệm dương tính không có vỏ bọc có thể nuôi cấy, có kích thước giống với virus đích để cho kiểu hình thái và hóa lý tốt. Virus kiểm soát quá trình phải ổn định trong môi trường tương tự với virus đích. Virus này phải có thể phân biệt được gen di truyền với virus đích, sao cho các phép phân tích PCR đối với virus đích và virus kiểm soát quá trình không phản ứng chéo và virus này thường không xuất hiện tự nhiên trong các loại thực phẩm cần kiểm tra.

Ví dụ về chuẩn bị virus kiểm soát quá trình được nêu trong Phụ lục D.

4.4.2 Kiểm soát ADN mạch kép (dsADN)

Đối với phép định lượng virus đích, các kết quả phải liên quan đến nồng độ chuẩn đã biết. Sử dụng dây pha loãng của ADN mạch kép mang trình tự đích quan tâm (5.3.8) và được định lượng bằng máy đo quang phổ để dựng đường chuẩn tính theo số bản sao mẫu trong một microlit. Tham khảo đường chuẩn để định lượng số bản sao gen virus phát hiện được trong một microlit có trong mẫu.

4.4.3 Kiểm soát ARN kiểm soát khuếch đại bên ngoài (EC)

Nhiều thực phẩm chứa các chất ức chế phản ứng RT-PCR và cũng có thể mang các chất ức chế này sang các giai đoạn tiếp theo. Để kiểm soát sự ức chế RT-PCR trong các mẫu riêng rẽ, cần bổ sung các ARN kiểm soát bên ngoài (EC) (các ARN mang trình tự đích được quan tâm, 5.3.9) vào mẫu ARN lỏng và được thử nghiệm bằng phương pháp RT-PCR. So sánh các kết quả của phương pháp này với các kết quả thu được của phương pháp EC ARN trong phép xác định mức ức chế RT-PCR trong từng mẫu thử không có ARN mẫu.

Ngoài các phương pháp kiểm soát ức chế RT-PCR, có thể sử dụng phương pháp EC ARN cho kết quả tương đương.

4.5 Kết quả thử nghiệm

Phương pháp này cho kết quả biểu thị bằng số bản sao hệ gen virus có thể phát hiện được trong một mililit, trong một gam hoặc trong một centimet vuông. Trong các mẫu không phát hiện có virus, thì các kết quả này phải được báo cáo là “không phát hiện được; < z số bản sao hệ gen virus có thể phát hiện được trong một mililit, trong một gam hoặc trong một centimet vuông” trong đó z là giới hạn phát hiện (LOD) của mẫu.

5 Thuốc thử

5.1 Yêu cầu chung

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích, trừ khi có quy định khác.

Đối với thực hành phòng thử nghiệm, xem TCVN 6404 (ISO 7218) ^[10].

5.2 Thuốc thử đã chuẩn bị sẵn để sử dụng

5.2.1 Nước loại dùng cho sinh học phân tử

5.2.2 Glycol polyetylen (PEG), khối lượng phân tử tương đối trung bình 8 000.

5.2.3 Natri clorua (NaCl).

5.2.4 Kali clorua (KCl).

5.2.5 Dinatri hydrophosphat (Na_2HPO_4).

5.2.6 Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4).

5.2.7 Tris base [*tris*(hydroxymetyl)aminometan].

5.2.8 Glyxin.

5.2.9 Bột chiết thịt bò.

5.2.10 Proteinase K (30 U/mg).

5.2.11 Pectinase từ *Aspergillus niger* hoặc *A. aculeatus*.

5.2.12 Cloroform.

5.2.13 Butanol.

5.2.14 Natri hydroxit (NaOH).

5.2.15 Axit clohydric (HCl).

5.2.16 Silica, chất phân giải, dung dịch đệm rửa và dung dịch đệm rửa giải để tách chiết ARN virus.

Thuốc thử phải có thể xử lý được 500 µl virus chiết được, sử dụng chất phân giải cùng dung dịch đệm chaotropic chứa guanidin thioxyanat (Tài liệu viện dẫn [1]) và sử dụng silica làm nền mẫu liên kết ARN. Tiếp theo, xử lý liên kết ARN-silica bằng dung dịch đệm rửa để loại bỏ tạp chất, ARN phải được rửa giải trong 100 µl dung dịch đệm rửa giải.

Chế phẩm ARN phải có chất lượng và nồng độ thích hợp với mục đích dự kiến. Xem Phụ lục E nêu chi tiết về các thuốc thử tách chiết ARN.

5.2.17 Thuốc thử dùng cho phản ứng real-time RT-PCR một bước

Các thuốc thử này phải xử lý được 5 µl ARN trong tổng thể tích 25 µl. Các thuốc thử này phải thích hợp cho phản ứng RT-PCR một bước sử dụng mẫu dò thủy phân (ADN polymerase được sử dụng

phải có hoạt tính 5'-3' exonuclease) và đủ nhạy để phát hiện các mức ARN virus điển hình tìm thấy được trong thực phẩm nhiễm virus. Xem Phụ lục B nêu chi tiết về thuốc thử real-time RT-PCR một bước.

5.2.18 Môi và mẫu dò thủy phân dùng để phát hiện HAV và norovirus GI và norovirus GII

Trình tự môi và mẫu dò thủy phân được công bố trên tạp chí uy tín và được kiểm chứng khi sử dụng dựa vào phổ rộng các chủng virus đích. Các môi để phát hiện HAV phải hướng đến vùng 5' không mã hóa của hệ gen. Các môi để phát hiện norovirus GI và norovirus GII phải có đích liên kết ORF1/ORF2 của hệ gen. Xem Phụ lục C nêu chi tiết về môi và mẫu dò thủy phân.

5.2.19 Môi và mẫu dò thủy phân dùng để phát hiện virus kiểm soát quá trình

Trình tự môi và mẫu dò thủy phân phải được công bố trên tạp chí uy tín và được kiểm chứng khi sử dụng dựa vào chủng virus kiểm soát quá trình được sử dụng. Các chủng này phải được chứng minh là không phản ứng chéo với virus đích.

5.3 Thuốc thử đã chuẩn bị

Do số lượng thuốc thử được sử dụng nhiều nên chi tiết về thành phần và chuẩn bị được nêu cụ thể trong Phụ lục F.

5.3.1 Dung dịch 5 x PEG/NaCl (PEG 8 000 nồng độ 500 g/l, NaCl 1,5 mol/l). Xem F.1.

5.3.2 Hỗn hợp cloroform/butanol. Xem F.2.

5.3.3 Dung dịch proteinase K. Xem F.3.

5.3.4 Dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS). Xem F.4.

5.3.5 Dung dịch đệm tris/glyxin/chất chiết thịt bò (TGBE). Xem F.5.

5.3.6 Vật liệu virus kiểm soát quá trình

Dung dịch virus kiểm soát quá trình gốc phải được pha loãng tối thiểu là 10 lần trong dung dịch đệm thích hợp, ví dụ: PBS (5.3.4). Dung dịch pha loãng này cho phép phát hiện hệ gen virus kiểm soát quá trình không bị ức chế, sử dụng phản ứng real-time RT-PCR, nhưng vẫn đủ nồng độ để dùng cho phép xác định tái lập của dung dịch pha loãng nhất được dùng cho đường chuẩn ARN của virus kiểm soát quá trình (8.4.2.2). Chia vật liệu của virus kiểm soát quá trình đã pha loãng thành các phần nhỏ để dùng cho mỗi lần và bảo quản ở $(-80 \pm 5) ^\circ\text{C}$. Xem Phụ lục D nêu chi tiết về cách chuẩn bị virus kiểm soát quá trình.

5.3.7 Hỗn hợp mastermix real-time RT-PCR dùng cho virus đích và virus kiểm soát quá trình

Bổ sung thuốc thử với các lượng quy định theo nhà sản xuất (5.2.17) để cho 20 µl hỗn hợp mastermix trên một phản ứng trong tổng thể tích 25 µl. Sử dụng mỗi và nồng độ mẫu dò tối ưu theo khuyến cáo của nhà sản xuất thuốc thử. Xem Phụ lục B nêu chi tiết về hỗn hợp mastermix real-time RT-PCR.

5.3.8 Vật liệu kiểm soát ADN mạch kép (dsADN)

Tách chiết các plasmid đã tinh sạch mang trình tự đích đối với từng virus đích được sử dụng. Các chế phẩm này sẽ không được gây ức chế phản ứng RT-PCR.

Nồng độ của từng dsADN gốc tính bằng số bản sao khuôn mẫu trong một microlit phải được xác định, sau đó pha loãng gốc từ nồng độ 1×10^4 đến 1×10^5 bản sao khuôn mẫu trong một microlit. Chia dsADN đã pha loãng (vật liệu kiểm soát dsADN) thành các phần nhỏ để dùng cho mỗi lần sử dụng và bảo quản lạnh ở $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ hoặc ở nhiệt độ thấp hơn. Xem Phụ lục G nêu chi tiết về cách chuẩn bị dsADN.

5.3.9 Vật liệu kiểm soát ARN kiểm soát bên ngoài (EC)

Tách các ssARN tinh sạch riêng rẽ mang trình tự đích đối với từng virus đích được sử dụng. Các ssARN này phải chứa mức nhiễm ADN đích không cao hơn 0,1 % và không gây ức chế phản ứng RT-PCR. Cần phải xác định nồng độ của từng EC ARN gốc tính bằng số bản sao có trong một microlit và EC ARN gốc phải được pha loãng từ nồng độ 1×10^6 đến 1×10^8 bản sao mẫu trong một microlit. Chia các chế phẩm EC ARN đã pha loãng (vật liệu kiểm soát EC ARN) thành các phần nhỏ để dùng cho mỗi lần sử dụng và bảo quản lạnh ở $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ hoặc ở nhiệt độ thấp hơn. Xem Phụ lục G nêu chi tiết về cách chuẩn bị của EC ARN.

6 Thiết bị, dụng cụ và vật liệu

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh chuẩn [xem TCVN 6404 (ISO 7218) ^[10]] và cụ thể như sau:

6.1 Micropipet và đầu tip với các dải cỡ, ví dụ: 1 000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl. Nên sử dụng đầu tip bền với sol khí trừ khi yêu cầu đầu tip thẳng, ví dụ: dùng để hút.

6.2 Pipet có lọc và pipet, với các dải cỡ, ví dụ: 25 ml, 10 ml, 5 ml.

6.3 Máy trộn Vortex.

6.4 Máy lắc, có thể vận hành ở tốc độ khoảng 500 dao động/min.

6.5 Máy ủ lắc, vận hành ở $(37 \pm 1,0)\text{ }^{\circ}\text{C}$ và (320 ± 20) dao động/min hoặc tương đương.

TCVN 10783-1:2015

6.6 Bộ lắc hoặc loại tương đương để sử dụng ở nhiệt độ phòng và vận hành ở $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$, (60 ± 5) dao động/min.

6.7 Bộ hút hoặc thiết bị tương đương để loại bỏ dung dịch phía trên.

6.8 Bộ gia nhiệt, có thể vận hành ở $(95 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ hoặc tương đương.

6.9 Nồi cách thủy, có thể vận hành ở $(60 \pm 2,0) ^\circ\text{C}$ hoặc tương đương.

6.10 Máy ly tâm và rotor, có thể vận hành với tốc độ, nhiệt độ như sau:

a) $10\ 000 \times g$ ở $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ với dung tích ống ít nhất là 35 ml thể tích;

b) $10\ 000 \times g$ ở $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ với dung tích ống cỡ hẹp (15 mm là quá lớn) bền với cloroform ít nhất là 1 ml thể tích;

c) $4\ 000 \times g$ ở nhiệt độ phòng với dung tích dùng cho dụng cụ cô lọc ly tâm (6.17).

6.11 Máy ly tâm micro.

6.12 Máy ly tâm, ống và chai micro ly tâm, với các dải cỡ: 1,5 ml, 5 ml, 15 ml, 50 ml .v.v... Nên sử dụng ống loại hẹp (15 mm là quá lớn) chịu được cloroform, có dung tích 1 ml.

6.13 Máy đo pH (hoặc dải thử pH)

6.14 Gạc bông vô trùng.

6.15 Túi lọc màng, dung tích 400 ml.

6.16 Bộ lọc màng tích điện dương, có cỡ lỗ $0,45 \mu\text{m}$ (đường kính 47 mm).

6.17 Dụng cụ cô lọc ly tâm, có dung tích 15 ml và ngưỡng phân tử lượng tương đối 100 kDa.

6.18 Nguồn chân không hoặc thiết bị tương đương dùng để lọc và dùng cho tháp lọc có đường kính lỗ màng lọc 47 mm.

6.19 Dao tách vỏ vô trùng để tách vỏ của động vật nhuyễn thể hai mảnh vỏ (BMS).

6.20 Bộ cao su, để tách vỏ BMS.

6.21 Kéo.

6.22 Kẹp.

6.23 Đĩa Petri vô trùng.

6.24 Lưỡi dao cạo hoặc bộ đồng hóa tương đương.

6.25 Găng tay bảo vệ an toàn.

6.26 Thiết bị tách chiết ARN thích hợp với phương pháp tách chiết dùng silica và hỗn hợp thuốc thử (5.2.1.6). Xem Phụ lục E nêu chi tiết về dụng cụ tách chiết ARN.

6.27 Máy real-time PCR, ví dụ: máy chu trình nhiệt, được gắn với nguồn năng lượng thích hợp để kích thích các phân tử huỳnh quang và có hệ thống detector huỳnh quang để phát hiện tín hiệu huỳnh quang sinh ra trong quá trình chạy PCR với mẫu dò thủy phân hóa học.

6.28 Dụng cụ kết hợp dùng cho phản ứng real-time RT-PCR, ví dụ: đĩa quang và nắp, thích hợp để sử dụng với máy real-time PCR đã chọn.

7 Lấy mẫu

Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể về lấy mẫu sản phẩm có liên quan thì cần đưa ra thỏa thuận giữa các bên.

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.

8 Cách tiến hành

8.1 Các yêu cầu chung của phòng thử nghiệm

Nếu mẫu đưa đến phòng thử nghiệm ở trạng thái không đông lạnh thì không được làm đông lạnh trước khi thử nghiệm. Nếu mẫu đưa đến phòng thử nghiệm ở trạng thái vừa đông lạnh thì phải rã đông trước khi thử nghiệm. Việc chiết mẫu và chạy PCR phải được thực hiện ở khu vực làm việc hoặc phòng riêng biệt như quy định trong ISO 22174.

8.2 Tách chiết virus

Việc lựa chọn phương pháp phụ thuộc vào nền mẫu thực phẩm cần thử nghiệm.

8.2.1 Vật liệu virus kiểm soát quá trình

Ngay trước khi xử lý mẻ mẫu thử, lấy các lượng thể tích vật liệu virus kiểm soát quá trình (5.3.6) đủ cho tất cả các mẫu riêng lẻ (10 µl trên một mẫu thử cộng với 25 µl dư).

Pha loãng (20 ± 0,5) µl phần vật liệu virus kiểm soát quá trình đã gộp đến 10⁻¹ (pha loãng 10 lần) bằng nước (5.2.1) và bảo quản ở (5 ± 3) °C tối đa 24 h hoặc chia thành các phần nhỏ để dùng mỗi lần và bảo quản ở -15 °C hoặc ở nhiệt độ thấp hơn để bảo quản lâu hơn.

8.2.2 Kiểm soát quá trình âm tính

Tiến hành chạy mẫu kiểm soát quá trình âm tính song song với chạy mẫu thử ở tần suất xác định theo chương trình đảm bảo chất lượng phòng thử nghiệm.

8.2.3 Bề mặt thực phẩm

Sử dụng gạc bông vô trùng đã làm ẩm trước trong PBC (5.3.4), lau bề mặt (diện tích tối đa 100 cm²) mẫu thử, ấn nhẹ gạc bông để dính các hạt chứa virus. Ghi lại phần diện tích gạc lau bằng centimet vuông.

Thêm (10 ± 0,1) µl vật liệu virus kiểm soát quá trình (8.2.1) vào gạc bông.

Ngay sau khi bổ sung vật liệu virus kiểm soát quá trình, nhúng gạc vào ống nghiệm chứa (490 ± 5) µl đệm phân giải, sau đó ép miếng gạc lên thành ống để loại bỏ chất lỏng. Lặp lại quá trình nhúng và ép ba lần hoặc bốn lần để đảm bảo thu được lượng virus tối đa.

Đối với bề mặt mẫu gồ ghề mà có thể làm hỏng gạc bông thì có thể dùng nhiều miếng gạc để xử lý hết bề mặt mẫu.

Giữ lại để chiết ARN.

8.2.4 Quả mềm và rau salad

Cắt (25 ± 0,3) g quả mềm hoặc rau salad thành miếng khoảng 2,5 cm x 2,5 cm x 2,5 cm (không cần cắt nếu quả có kích thước nhỏ hơn kích thước này) và chuyển vào khoang đựng mẫu của túi lọc màng dung tích 400 ml.

Thêm (40 ± 1) ml dung dịch đệm TGBE (5.3.5) (đối với mẫu quả mềm, thêm pectinase 30 đơn vị từ *A.niger*, hoặc pectinase 1 140 đơn vị từ *A. aculeatus* vào dung dịch đệm) và (10 ± 0,1) µl vật liệu virus kiểm soát quá trình (8.2.1).

Ủ ở nhiệt độ phòng và lắc liên tục ở khoảng 60 dao động/min trong (20 ± 1) min. Đối với quả mềm có tính axit thì cứ 10 min trong quá trình ủ lại kiểm tra pH của dịch quả. Nếu pH thấp dưới 9,0 thì phải chỉnh đến 9,5 ± 0,1 bằng NaOH. Kéo dài thời gian ủ 10 min mỗi lần để điều chỉnh pH. Gạn dịch rửa giải từ khoang lọc vào ống ly tâm (sử dụng hai ống, nếu cần, để thu được thể tích thích hợp).

Làm trong dịch rửa giải thu được bằng cách ly tâm ở 10 000 x g trong (30 ± 5) min ở (5 ± 3) °C.

Gạn phần nổi phía trên vào một ống hoặc chai sạch và chỉnh đến pH 7,0 ± 0,5 bằng HCl.

Thêm các phần 0,25 thể tích của dung dịch 5 x PEG/NaCl (5.3.1) (để tạo nồng độ cuối cùng PEG 100 g/l, NaCl 0,3 mol/l), lắc để đồng hóa trong (60 ± 5) s sau đó ủ và lắc liên tục ở khoảng 60 dao động/min ở (5 ± 3) °C trong (60 ± 5) min.

Ly tâm ở 10 000 x g trong (30 ± 5) min ở (5 ± 3) °C (chia thể tích sang hai ống ly tâm, nếu cần).

Gạn và loại bỏ phần nổi phía trên, sau đó ly tâm ở 10 000 x g trong (5 ± 1) min ở (5 ± 3) °C để tạo thành dạng hạt đặc.

Gạn bỏ phần nổi phía trên và hòa lại hạt mẫu trong (500 ± 10) µl PBS (5.3.4). Nếu mẫu đã chia sang hai ống thì hòa lại cả hai phần hạt mẫu trong cùng một thể tích PBS.

Để chiết mẫu rau salad, chuyển chất lỏng phía trên vào ống thích hợp và giữ lại để tách chiết ARN.

Đối với quá trình chiết từ quả mềm, cần tiến hành bước làm trong tiếp theo. Chuyển huyền phù vào ống ly tâm loại hẹp chịu được cloroform (6.12). Thêm (500 ± 10) µl hỗn hợp cloroform/butanol (5.3.2), trộn bằng máy Vortex, sau đó ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 min.

Ly tâm ở 10 000 x g trong (15 ± 1) min ở (5 ± 3) °C. Chuyển cẩn thận pha lỏng vào một ống mới và giữ lại để tách chiết ARN.

8.2.5 Nước uống đóng chai

Trong tiêu chuẩn này thể tích thích hợp là từ 0,3 lít đến 5 lít. Đối với từng mẫu, ghi lại thể tích thử nghiệm.

Thêm $(10 \pm 0,1)$ µl vật liệu virus kiểm soát quá trình (8.2.1) vào mẫu cần thử nghiệm. Lắc để trộn.

Dùng chân không hoặc nguồn áp lực dương (6.18), sử dụng kỹ thuật vô trùng lọc toàn bộ mẫu qua bộ lọc màng tích điện dương 47 mm (6.16). Chuyển dịch lọc vào ống vô trùng, sau đó thêm $(4 \pm 0,1)$ ml dung dịch đệm TGBE (5.3.5).

Thêm $(10 \pm 0,2)$ ml dung dịch đệm TGBE vào chai rỗng. Lắc cả ống và chai ở tốc độ khoảng 500 dao động/min trong (20 ± 5) min.

Gộp dịch rửa giải từ ống nghiệm và chai với nhau vào một ống sạch.

Rửa thành trong của chai bằng cách thêm $(2 \pm 0,1)$ ml dung dịch đệm TGBE, lắc mạnh và đảo chiều bằng tay, rồi cho hết vào ống nghiệm.

Chỉnh pH của dịch rửa giải đến $7,0 \pm 0,5$ bằng HCl 0,1 mol/l và chuyển vào dụng cụ cô lọc ly tâm (6.17).

Ly tâm ở 4 000 x g trong (15 ± 1) min. Chuyển dịch cô đặc vào một ống sạch.

Chỉnh thể tích đến (500 ± 10) µl bằng PBS (5.3.4). Giữ lại để tách chiết ARN.

8.2.6 Động vật nhuyễn thể hai mảnh vỏ (BMS)

BMS dùng để phân tích phải sống hoặc nếu đông lạnh thì không bị hư hỏng. Phải loại bỏ bùn bám trên vỏ. Không được ngâm lại BMS vào trong nước.

Dùng dao vô trùng tách vỏ tối thiểu 10 BMS. Khi tách, cần sử dụng găng tay bảo vệ để giữ động vật nhuyễn thể và kê mẫu trên bề cao su.

Dùng kéo hoặc kẹp hoặc dụng cụ tương đương cắt bỏ tuyến tiêu hóa của tất cả các mẫu động vật và chuyển vào đĩa Petri sạch. Khối lượng ruột tối thiểu cần là $(2,0 \pm 0,2)$ g.

Cuối cùng, cắt tuyến tiêu hóa bằng lưỡi dao lam hoặc bộ đồng hóa tương đương để thu được mẫu dạng bột nhão, sau đó chuyển $(2,0 \pm 0,2)$ g vào ống ly tâm.

Thêm $(10 \pm 0,1)$ μ l vật liệu virus kiểm soát quá trình (8.2.1).

Thêm $(2,0 \pm 0,2)$ ml dung dịch protease K (5.3.3) và trộn. Ủ ở $(37 \pm 1,0)$ °C, đồng thời lắc ở tốc độ 320 dao động/min trong máy ủ lắc hoặc loại tương đương trong (60 ± 5) min.

Tiến hành ủ lần thứ hai bằng cách đặt ống nghiệm vào nồi cách thủy hoặc thiết bị tương đương ở $(60 \pm 2,0)$ °C trong (15 ± 1) min.

Ly tâm ở 3 000 x g trong $(5,0 \pm 0,5)$ min ở nhiệt độ phòng, gạn phần nổi phía trên vào một ống sạch, đo và ghi lại thể tích phần nổi phía trên, bằng mililit và giữ lại để tách chiết ARN.

8.3 Tách chiết ARN

Tách chiết ARN từ (500 ± 10) μ l của mỗi mẫu thử sử dụng chất phân rã guanidin thiocyanat thích hợp và phương pháp hấp thụ trên nền silica. Rửa giải ARN đã tinh sạch trong (100 ± 2) μ l dung dịch đệm rửa giải và giữ lại để phân tích real-time RT-PCR. ARN chiết được phải được xử lý ngay, bảo quản ở (5 ± 3) °C trong < 8 h hoặc ở -15 °C hoặc nhiệt độ thấp hơn lên đến 6 tháng.

Nếu cần bảo quản lâu thì nên bảo quản ở nhiệt độ (-80 ± 5) °C.

Đối với từng mẻ mẫu thử phải bao gồm cả kiểm soát tách chiết âm tính, trừ khi mẻ mẫu thử bao gồm mẫu kiểm soát quá trình âm tính (8.2.2). Tiến hành tách chiết ARN sử dụng cùng một phương pháp thực hiện đồng thời trên (500 ± 10) μ l nước (5.2.1).

Xem Phụ lục E nêu chi tiết về phương pháp tách chiết ARN.

8.4 Phương pháp real-time RT-PCR

8.4.1 Yêu cầu chung

Các yêu cầu tối thiểu đối với phương pháp khuếch đại và phát hiện các trình tự axit nucleic bằng phương pháp real-time PCR quy định trong ISO 22174.

8.4.2 Phương pháp real-time RT-PCR

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện HVA, norovirus nhóm gen I và norovirus nhóm gen II.

Trong trường hợp nhất định, không cần thử nghiệm cả ba virus trong một mẫu đơn lẻ. Quy trình nêu dưới đây có thể phân tích mẫu thử cho một virus (nghĩa là: HAV, norovirus nhóm gen I hoặc norovirus nhóm gen II) và bao gồm một bộ đầy đủ các kiểm soát khuyến cáo. Phòng thử nghiệm cần thử nhiều hơn một virus đích để điều chỉnh chương trình phản ứng cho các phép thử bổ sung. Sơ đồ bố trí điển hình được nêu trong Phụ lục I. Các phương pháp thích hợp khác có thể dùng để kiểm soát sự ức chế RT-PCR được chứng minh là cho hiệu quả tương đương với việc sử dụng EC ARN.

8.4.2.1 Phân tích virus đích

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng 10^{-1} của mỗi ARN mẫu trong nước (5.2.1).

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} và 10^{-4} của vật liệu kiểm soát dsADN đích (5.3.8) trong nước (5.2.1).

Đối với mỗi mẫu chuẩn bị:

- hai giếng của một đĩa quang với $(5 \pm 0,1)$ μl ARN mẫu không pha loãng;
- hai giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl ARN mẫu ở độ pha loãng 10^{-1} ;
- một giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl ARN mẫu không pha loãng và $(1 \pm 0,05)$ μl EC ARN không pha loãng (5.3.9);
- một giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl ARN mẫu ở độ pha loãng 10^{-1} và $(1 \pm 0,05)$ μl EC ARN không pha loãng.

Đối với kiểm soát EC ARN chuẩn bị:

- một giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl nước (5.2.1) và $(1 \pm 0,05)$ μl EC ARN không pha loãng.

Đối với đường chuẩn dsADN chuẩn bị:

- hai giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl dsADN không pha loãng;
- hai giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl dsADN ở độ pha loãng 10^{-1} ;
- hai giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl dsADN ở độ pha loãng 10^{-2} ;
- hai giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl dsADN ở độ pha loãng 10^{-3} ;

TCVN 10783-1:2015

- hai giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl dsADN ở độ pha loãng 10^{-4} .

Đối với các kiểm soát âm tính chuẩn bị:

- một giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl nước (5.2.1);
- một giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl ARN kiểm soát tách chiết âm tính hoặc ARN kiểm soát quá trình âm tính;

Cho $(20 \pm 0,5)$ μl hỗn hợp mastermix real-time RT-PCR liên quan (5.3.7) vào mỗi giếng (hỗn hợp mastermix cũng có thể được cho vào các giếng liên quan trước khi cho vật liệu khuôn mẫu vào).

8.4.2.2 Phân tích virus kiểm soát quá trình

Nếu cần, rã đông một phần lượng vật liệu virus kiểm soát quá trình (8.2.1) đã pha loãng (ở độ pha loãng 10^{-1}) đối với mẻ mẫu thử.

Gia nhiệt ở (95 ± 2) °C trong $(5,0 \pm 0,5)$ min sử dụng buồng gia nhiệt hoặc thiết bị tương đương để giải phóng ARN.

Làm lạnh nhanh các ống, ly tâm ở $\geq 3\ 000 \times g$ trong 1 min, sau đó chuyển phần nổi phía trên (“ARN virus kiểm soát quá trình”) vào ống mới.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ARN virus kiểm soát quá trình trong nước (5.2.1) đối với từng mẻ vật liệu virus kiểm soát quá trình.

Đối với mỗi mẫu chuẩn bị:

- một giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl ARN mẫu không pha loãng;
- một giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl ARN mẫu ở độ pha loãng 10^{-1} ;

Đối với đường chuẩn ARN virus kiểm soát quá trình chuẩn bị:

- một giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl ARN virus kiểm soát quá trình không pha loãng;
- một giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl ARN virus kiểm soát quá trình ở độ pha loãng 10^{-1} ;
- một giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl ARN virus kiểm soát quá trình ở độ pha loãng 10^{-2} ;
- một giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl ARN virus kiểm soát quá trình ở độ pha loãng 10^{-3} ;

Đối với các quá trình kiểm soát âm tính chuẩn bị:

- một giếng với $(5 \pm 0,1)$ μl nước (5.2.1);

- một giếng với $(5 \pm 0,1)$ μ l ARN virus kiểm soát tách chiết âm tính hoặc ARN virus kiểm soát quá trình âm tính.

Cho $(20 \pm 0,5)$ μ l hỗn hợp mastermix real-time RT-PCR virus kiểm soát quá trình (5.3.7) vào mỗi giếng (hỗn hợp mastermix cũng có thể được cho vào các giếng liên quan trước khi cho vật liệu mẫu vào).

8.4.2.3 Khuếch đại

Đưa đĩa vào chu trình phản ứng bao gồm giai đoạn đầu để phiên mã ngược và ở ít nhất 45 chu kỳ PCR sử dụng máy real-time PCR (6.27). Khoảng thời gian và nhiệt độ của từng giai đoạn (phiên mã ngược, bất hoạt RT, biến tính, bắt cặp, kéo dài) phụ thuộc vào thuốc thử được sử dụng; chúng phải dựa trên các khuyến cáo của nhà sản xuất nhưng có thể được tối ưu hóa tiếp.

Đối với các máy real-time PCR thì người sử dụng có thể cài đặt điểm thu dữ liệu huỳnh quang, điểm này phải cố định ở điểm cuối của giai đoạn kéo dài.

Xem Phụ lục B nêu chi tiết về phương pháp khuếch đại.

8.4.2.4 Phân tích dữ liệu huỳnh quang

Các yêu cầu tối thiểu đối với phép phân tích dữ liệu khuếch đại được quy định trong ISO 22174. Sử dụng phương pháp khuyến cáo của nhà sản xuất máy real-time PCR phân tích đồ thị khuếch đại. Các ngưỡng phải được cài đặt sao cho chạy qua diện tích đồ thị khuếch đại (quan sát đồ thị logarit) là song song (pha chỉ số).

Tất cả các điểm khuếch đại phải được kiểm tra để nhận biết các kết quả dương tính giả (phản ứng với giá trị C_q không liên quan đến độ khuếch đại tăng theo số mũ) gây ra do tín hiệu nền cao hoặc không đều. Điều này sẽ được ghi lại và các kết quả của bất kỳ phản ứng nào bị ảnh hưởng tương tự được coi là âm tính. Ngoài ra, tất cả các điểm huỳnh quang dương tính đúng phải được kiểm tra để đảm bảo rằng giá trị C_q tạo ra bởi phần mềm phân tích tương ứng (và không bị vênh do tín hiệu nền cao hoặc không đều). Khi các giá trị C_q bị vênh, thì ghi lại các giá trị C_q đã hiệu chỉnh phù hợp với giá trị tạo ra bởi phần mềm. Giá trị C_q đã hiệu chỉnh được sử dụng cho phép tính hiệu quả.

9 Diễn giải kết quả

9.1 Yêu cầu chung

Mỗi kiểm soát (dsADN, EC ARN, ARN virus kiểm soát quá trình) có một giá trị dự kiến hoặc một dải giá trị dự kiến. Nếu các kết quả quan sát được của mọi phép kiểm soát khác với kết quả dự kiến thì có thể cần thử nghiệm lại mẫu.

TCVN 10783-1:2015

Các kiểm soát âm tính [nước (5.2.1), tách chiết âm tính hoặc kiểm soát quá trình] phải luôn luôn âm; nếu xuất hiện các kết quả dương trong các kiểm soát này thì bất kỳ mẫu cho các kết quả dương phải được thử nghiệm lại.

9.2 Dựng đường chuẩn ARN virus kiểm soát quá trình

Kiểm tra các giá trị C_q của dãy đường chuẩn pha loãng (ARN virus kiểm soát quá trình, dsADN đích) về mọi điểm nằm xa đường thẳng đi qua nhiều điểm nhất. Các giá trị C_q này sẽ không được đưa vào để tính đường chuẩn.

Sử dụng các giá trị C_q còn lại của mỗi dãy pha loãng để dựng đường chuẩn. Bao gồm tối thiểu ba độ pha loãng (ARN virus kiểm soát quá trình) hoặc bốn độ pha loãng (dsADN). Đường chuẩn có giá trị $r^2 < 0,98$, trong đó r là hệ số tương quan Pearson, không được dùng để tính toán.

9.3 Tính hiệu quả khuếch đại

Trong tiêu chuẩn này, hiệu quả khuếch đại chỉ được dùng làm thông số đảm bảo chất lượng và không được dùng để điều chỉnh kết quả thử.

Sử dụng giá trị C_q của giếng ARN + EC ARN mẫu không pha loãng để đánh giá hiệu quả khuếch đại bằng cách tham khảo giá trị C_q của giếng nước + EC ARN và độ dốc của đường chuẩn dsADN.

Nếu hiệu quả khuếch đại $> 25\%$ thì các kết quả đối với ARN không pha loãng được dùng cho mẫu đó. Nếu hiệu quả khuếch đại $< 25\%$ thì lặp lại phép tính với giếng ARN + EC ARN mẫu ở độ pha loãng 10^{-1} .

Nếu hiệu quả khuếch đại sử dụng mẫu ARN ở độ pha loãng $10^{-1} > 25\%$ thì các kết quả đối với mẫu ARN ở độ pha loãng 10^{-1} phải được dùng cho mẫu đó. Nếu hiệu quả khuếch đại cho cả mẫu ARN không pha loãng và mẫu ARN ở độ pha loãng $10^{-1} < 25\%$ thì các kết quả không có giá trị và mẫu phải được thử nghiệm lại.

CHÚ THÍCH 1 Mẫu cho cùng giá trị C_q như mẫu EC ARN không pha loãng có hiệu quả khuếch đại là 100%. Đối với đường chuẩn dsADN có độ dốc lý tưởng $-3,32$, nếu giá trị C_q của giếng ARN + EC ARN mẫu $< 2,00$ lớn hơn giá trị C_q của giếng nước + EC ARN thì hiệu quả khuếch đại $> 25\%$ và do đó có thể chấp nhận được. Nếu giá trị C_q của giếng ARN + EC ARN mẫu $> 2,00$ lớn hơn giá trị C_q của giếng nước + EC ARN thì hiệu quả khuếch đại $< 25\%$ và do đó không chấp nhận được.

CHÚ THÍCH 2 Mẫu cho hiệu quả khuếch đại không chấp nhận được nhưng có thể cho kết quả đánh giá dương tính theo cách khác, nếu có thể, được báo cáo là dương như mô tả trong Điều 10.

CHÚ THÍCH 3 Nếu sử dụng phương pháp thay thế để xác định hiệu quả khuếch đại thì cần điều chỉnh quy trình này để đưa ra cùng mức chính xác.

9.4 Tính hiệu quả chiết

Trong tiêu chuẩn này, hiệu quả chiết chỉ được dùng làm thông số đánh giá chất lượng và không được dùng để điều chỉnh kết quả.

Sử dụng giá trị C_q cho phép phân tích virus kiểm soát quá trình từ giếng mẫu thử ARN (không pha loãng hoặc độ pha loãng 10^{-1}) tùy thuộc vào các kết quả của hiệu quả khuếch đại (9.3) để đánh giá độ thu hồi của virus kiểm soát quá trình bằng cách tham khảo đường chuẩn ARN của virus kiểm soát quá trình (nếu sử dụng các kết quả của mẫu ARN độ pha loãng 10^{-1} thì nhân với 10 để hiệu chỉnh hệ số pha loãng).

Đối với các mẫu BMS, tính hiệu quả chiết bằng cách chia độ thu hồi cho 0,5 và nhân với tổng thể tích dịch mẫu đồng nhất đo được.

Đối với các nền mẫu khác, hiệu quả chiết bằng độ thu hồi của virus kiểm soát quá trình.

Khi hiệu quả chiết $< 1 \%$ thì các kết quả mẫu không có giá trị và mẫu cần được thử nghiệm lại.

CHÚ THÍCH 1 Mẫu tạo ra cùng giá trị C_q với ARN virus kiểm soát quá trình không pha loãng có độ thu hồi virus kiểm soát quá trình (bằng hiệu quả chiết trong các nền mẫu khác với BMS) là 100 %. Đối với đường chuẩn ARN virus kiểm soát quá trình có độ dốc lý tưởng $-3,32$, nếu giá trị C_q của giếng ARN mẫu không pha loãng $< 6,64$ lớn hơn giá trị C_q ARN virus kiểm soát quá trình không pha loãng thì độ thu hồi virus kiểm soát quá trình của mẫu đó $> 1 \%$ và do đó có thể chấp nhận được.

CHÚ THÍCH 2 Mẫu cho hiệu quả chiết không thể chấp nhận được nhưng có thể cho kết quả đánh giá dương tính theo cách khác, nếu có, được báo cáo là dương như mô tả trong Điều 10.

9.5 Định lượng mẫu

Đối với mỗi virus đích, lấy các giá trị C_q chỉ của các giếng ARN mẫu (không pha loãng hoặc đã pha loãng 10^{-1} tùy thuộc vào kết quả của hiệu quả khuếch đại; 9.3) và dùng các giá trị này để tính nồng độ virus đích (tính bằng số bản sao gen virus có thể phát hiện được trong microlit ARN) cho mỗi độ lặp lại bằng cách tham khảo đường chuẩn dsADN. Các lần lặp lại âm tính được coi là định lượng bằng không. Đối với từng mẫu, tính giá trị nồng độ trung bình của hai lần lặp lại.

Nhân giá trị này với 100 (ARN không pha loãng) hoặc 1 000 (ARN ở độ pha loãng 10^{-1}) để tính lượng virus đích trong 100 μ l ARN và trong 500 μ l virus chiết được (toàn bộ mẫu dùng cho nền mẫu không phải BMS).

Đối với các mẫu BMS, tính lượng virus có thể phát hiện được trong toàn bộ mẫu bằng cách chia giá trị trên cho 0,5 và nhân với tổng thể tích dịch mẫu đồng nhất.

Để thu được lượng virus đích ước tính, tính bằng số bản sao hệ gen virus có thể phát hiện được trong một mililit, trong một gam hoặc trong một centimet vuông thì chia số bản sao hệ gen trong toàn bộ mẫu cho thể tích ban đầu (nước uống đóng chai), khối lượng (BMS, quả mềm, rau salad) hoặc diện tích (bề mặt cứng) của mẫu.

9.6 Giới hạn phát hiện lý thuyết

Giới hạn phát hiện lý thuyết (tLOD) là mức mà các thành phần có lượng virus đích nhỏ nhất có thể phát hiện được theo lý thuyết. Điều này tương ứng với một bản sao hệ gen trên một thể tích ARN được thử nghiệm trong phép phân tích virus đích, nhưng thay đổi theo nền mẫu thử và lượng vật liệu khởi động.

Đối với mỗi mẫu bề mặt cứng, quả mềm, rau salad hoặc nước đóng chai thì lượng virus đích tối thiểu trong toàn mẫu có thể phát hiện được theo lý thuyết là 10 (các kết quả sử dụng ARN mẫu không pha loãng) hoặc 100 bản sao hệ gen (ARN độ pha loãng 10^{-1}).

Đối với các mẫu BMS, lượng virus đích tối thiểu có thể phát hiện được theo lý thuyết thu được bằng cách chia giá trị trên cho 0,5 và nhân theo tổng thể tích dịch mẫu đồng nhất.

Để thu được tLOD của mỗi mẫu tính bằng số bản sao hệ gen virus có thể phát hiện được trên mililit, trên gam hoặc trên centimet vuông thì chia số lượng bản sao hệ gen virus có thể phát hiện trong toàn bộ mẫu cho thể tích ban đầu (nước đóng chai), khối lượng (BMS, quả mềm, rau salad) hoặc diện tích (bề mặt cứng) của mẫu.

10 Biểu thị kết quả

Các kết quả dương đối với mỗi virus đích được biểu thị là “x số bản sao hệ gen virus có thể phát hiện được trong một mililit”, “x số bản sao hệ gen virus có thể phát hiện được trong một gam” hoặc “x số bản sao hệ gen virus có thể phát hiện được trong một centimet vuông” trong đó x là số lượng tính được đối với mẫu đó, với điều kiện là mức này cao hơn mức giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp.

Nếu phát hiện được ARN đích ở mức $< LOQ$ thì các kết quả được biểu thị là “hệ gen virus phát hiện được ở mức thấp hơn mức định lượng” như sau (“y số bản sao hệ gen virus có thể phát hiện được trong một mililit”, “y số bản sao hệ gen virus có thể phát hiện được trong một gam” hoặc “y số bản sao hệ gen virus có thể phát hiện được trong một centimet vuông”), trong đó y là LOQ của phương pháp.

Nếu không phát hiện được virus đích thì kết quả được biểu thị là “không phát hiện” như sau (“ $< z$ số bản sao hệ gen virus có thể phát hiện được trong một mililit”, “ $< z$ số bản sao hệ gen virus có thể phát hiện được trong một gam” hoặc “ $< z$ số bản sao hệ gen virus có thể phát hiện được trong một centimet vuông”), trong đó z là giới hạn phát hiện của phương pháp (LOD).

Nếu không thu được kết quả có giá trị, thì các kết quả thường được biểu thị là “không có kết quả”. Tuy nhiên, nếu thu được kết quả dương có giá trị khác từ mẫu cho thấy hiệu quả khuếch đại hoặc hiệu quả chiết không chấp nhận được thì kết quả có thể được biểu thị như trên. Các chi tiết phải được đưa vào báo cáo thử nghiệm.

Nếu sử dụng các kết quả từ mẫu ARN ở độ pha loãng 10^{-1} , thì các giá trị LOD và LOQ phải được điều chỉnh tăng bằng cách nhân với 10.

11 Báo cáo thử nghiệm

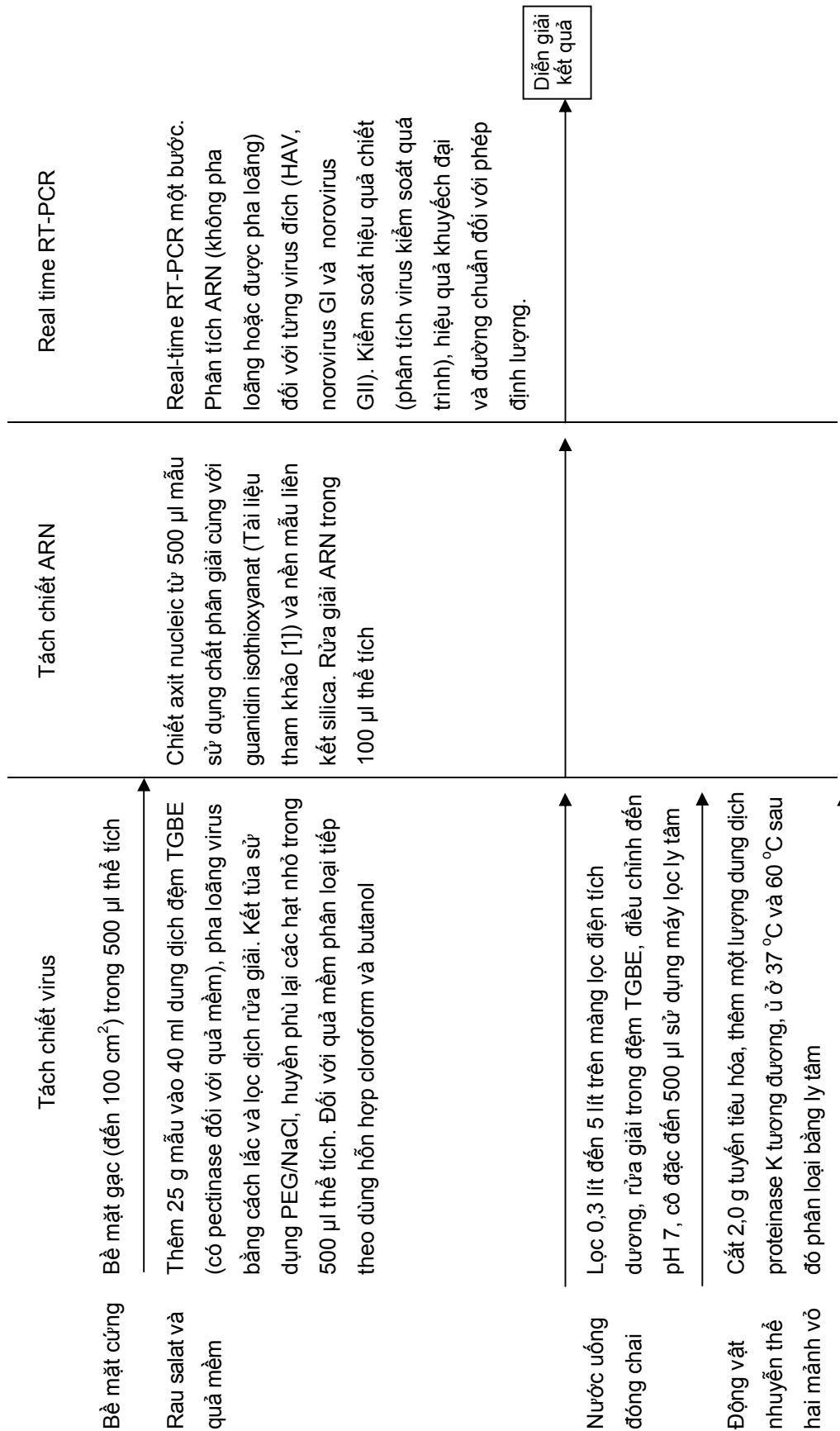
Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau đây:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được coi là tùy chọn cùng với các tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- e) pLOD (3.17) và LOQ (3.18) của phương pháp (được điều chỉnh để tính khi sử dụng mẫu ARN ở độ pha loãng 10^{-1} , nếu cần) và nền mẫu được thiết lập;
- f) tLOD (3.16) của mẫu;
- g) hiệu quả chiết mẫu (9.4);
- h) kết quả thử thu được, biểu thị theo Điều 10.

Phụ lục A

(Quy định)

Sơ đồ quy trình



Hình A.1 – Sơ đồ quy trình

Phụ lục B
(Tham khảo)

Hỗn hợp mastermix real-time RT-PCR và thông số chu trình

Đối với thành phần hỗn hợp mastermix real-time RT-PCR một bước sử dụng hệ thống invitrogen ARN ultrasense^{TM1)} qRT-PCR một bước, xem Bảng B.1 và các thông số chu trình, xem Bảng B.2.

Bảng B.1 – Hỗn hợp mastermix

| Thuốc thử | Nồng độ cuối (trong 25 µl) | Thể tích trên phản ứng (µl) |
|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 5 × hỗn hợp phản ứng Ultrasense | 1× | 5 ± 0,1 |
| Mồi FW | 0,5 pmol/µl | Theo yêu cầu |
| Mồi REV | 0,9 pmol/µl | Theo yêu cầu |
| Mẫu dò | 0,25 pmol/µl | Theo yêu cầu |
| Chất nhuộm màu chuẩn ROX (50 ×) | Theo yêu cầu ^a | Theo yêu cầu |
| Hỗn hợp enzym Ultrasense ARN | — | 1,25 ± 0,05 |
| Nước (5.2.1) | — | Theo yêu cầu |
| Tổng thể tích | — | 20 ± 0,2 |

^a Máy real-time PCR Biosystems Applied, ROX sử dụng ở nồng độ 1× ; đối với Stratagen MX3000, ROX có thể cũng được sử dụng ở nồng độ 0,1× hoặc bỏ qua hỗn hợp mastermix. Đối với máy khác, tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Máy real-time PCR Biosystems Applied và Stratagen MX3000 là các sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng.

Bảng B.2 – Thông số chu trình

| Mô tả các bước | Nhiệt độ và thời gian | Số chu trình | |
|-----------------|-----------------------|-------------------|----|
| RT | 55 °C trong 1 h | 1 | |
| Gia nhiệt trước | 95 °C trong 5 min | 1 | |
| Khuếch đại | Biến tính | 95 °C trong 15 s | |
| | Bắt cặp-kéo dài | 60 °C trong 1 min | 45 |
| | | 65 °C trong 1 min | |

¹⁾ Invitrogen RNA UltrasenseTM là tên thương mại của sản phẩm được cung cấp từ Invitrogen. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

Phụ lục C
(Tham khảo)

Mồi real-time RT-PCR và mẫu dò thủy phân để phát hiện HAV, norovirus GI, norovirus GII và virus mengo (kiểm soát quá trình)

C.1 HAV

| | | |
|---------------------|----------------------------|------------------------|
| HAV68 (FW) | TCA CCG CCG TTT GCC TAG | Tài liệu tham khảo [2] |
| HAV240 (REV) | GGA GAG CCC TGG AAG AAA G | Tài liệu tham khảo [2] |
| HAV150 (-) (PROBE): | CCT GAA CCT GCA GGA ATT AA | Tài liệu tham khảo [2] |

Mẫu dò được dán nhãn: tại đầu 5' với 6-carboxyfluorescein (FAM); tại đầu 3' với MGBNFQ (chất kết dính phụ/chất hấp thụ không huỳnh quang).

Bộ mồi này khuếch đại sản phẩm có kích thước 173 bp tương ứng với 68-240 nucleotid của HAV phân lập HM174 43c (số đăng ký Ngân hàng Gen M59809).

Dãy trình tự sử dụng tất cả trình tự có sẵn trong Ngân hàng gen của phép phân tích vùng đích chứng minh rằng cặp mồi và mẫu dò này đủ để định lượng tất cả các kiểu gen của HAV. Ngoài ra, phép phân tích phổ đột biến của một gen các chủng biến đổi cho thấy vùng này không dễ thay đổi và phép phân tích này sẽ ổn định lâu dài. Tính đặc hiệu của các mồi đã được kiểm chứng bằng 10 picornavirus khác nhau: poliovirus (chủng vacin huyết thanh typ 1); enterovirus B ở người (echovirus typ1); enterovirus B ở người (echovirus typ 11); enterovirus B ở người (echovirus typ 30); enterovirus B ở người (Coxsackie virus-B5); enterovirus C ở người (Coxsackie virus-A24); enterovirus D ở người (eterovirus 70); enterovirus ở bò; teschovirus ở lợn (enterovirus typ 1 ở bò) và virus encephalomyocarditis. Virus enteric khác cũng được sử dụng như: virus hespatitis E, rotavirus người và bò (nhóm A), norovirus, mamastrovirus (astrovirus typ 1 ở người) và adenovirus F ở người (enteric adenovirus typ 40). Không có phép thử virus nào cho kết quả dương cũng như ở nồng độ cao (10^6 đến 10^8 TCID50/ml hoặc cặn huyền phù không pha loãng 0,1 g/ml) hoặc nồng độ thấp (10^4 TCID50/ml hoặc cặn huyền phù 0,1 g/ml của dịch pha loãng ở độ pha loãng 10^{-1}). LOD của phép phân tích là 10 phân tử ssARN, 1 phân tử ARN và 0,05 virus lây nhiễm trên phản ứng (Tài liệu tham khảo [2]).

C.2 Norovirus GI

| | | |
|-----------------|--------------------------------|------------------------|
| QNIF4 (FW) | CGC TGG ATG CGN TTC CAT | Tài liệu tham khảo [3] |
| NV1LCR (REV) | CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC | Tài liệu tham khảo [4] |
| NVGG1p (PROBE): | TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT | Tài liệu tham khảo [4] |

Mẫu dò được dán nhãn: tại đầu 5' với 6-carboxyfluorescein (FAM); tại đầu 3' với 6-carboxytetramethylrhodamin (TAMRA).

Bộ mồi này khuếch đại sản phẩm có kích thước 86 bp tương ứng với 5291-5376 nucleotid của Norwalk virus (số đăng ký Ngân hàng Gen M87661).

C.3 Norovirus GII

| | | |
|----------------|------------------------------------|------------------------|
| QNIF2 (FW) | ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA | Tài liệu tham khảo [5] |
| COG2R (REV) | TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA | Tài liệu tham khảo [6] |
| QNIFs (PROBE): | AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG | Tài liệu tham khảo [5] |

Mẫu dò được dán nhãn: tại đầu 5' với 6-carboxyfluorescein (FAM); tại đầu 3' với 6-carboxytetramethylrhodamin (TAMRA).

Bộ mồi này khuếch đại sản phẩm kích thước 89 bp tương ứng với 5012-5100 nucleotid của Lordsdale virus (số đăng ký Ngân hàng Gen X86557).

Diện tích được chọn để phát hiện norovirus là vùng bảo tồn tốt tại đầu 5' của ORF2 (Tài liệu tham khảo [6]). Các dãy trình tự sử dụng tất cả các trình tự có sẵn trong Ngân hàng gen của phép phân tích vùng đích chứng minh rằng bộ mồi và mẫu dò này đủ để định lượng tất cả Nov GI và Nov GII tương ứng. Ngoài ra, sử dụng 18 chủng NoV chuẩn: GI.1 (Norwalk virus); GI.2 (Whiterose); GI.3 (Southampton); GI.4 (Malta); GI.5 (Musgrove); GI.6 (Mikkeli); GI.7 (Winchester); GI.10 (Boxer), GII.1 (Hawaii); GII.2 (Melksham); GII.3 (Toronto); GII.4 (Grismyby); GII.6 (Seacroft); GII.7 (Leeds); GII.10 (Erfurt); biến thể GIIb; biến thể GIIC và GIV (Alphatron) để kiểm chứng hiệu quả và độ nhạy của mồi và mẫu dò.

Tính đặc hiệu của mồi đã được kiểm chứng bằng sáu virus enteric ở người khác nhau: poliovirus (chủng vaccin huyết thanh typ 1); virus hepatitis A; virus hepatitis E ; virus aichi ; astrovirus và rotavirus. Tính đặc hiệu cũng đã được thử nghiệm trên bảy loại vi khuẩn có thể phát hiện được trong BMS: *Escherichia coli*; *Shewenella putrefaciens*, *Chromobacterium violaceum*, *Aeromonas sobria*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio paraheamolyticus* và *Vibrio cholerea*). Không có phép thử virus hoặc vi khuẩn nào cho kết quả dương. LOD của phép phân tích là 1 đến 10 phân tử ARN virus (phụ thuộc vào chủng NoV) (Tài liệu tham khảo [5], [7]).

C.4 Virus mengo

| | | |
|--------------------|------------------------------------|------------------------|
| Mengo 110 (FW): | GCG GGT CCT GCC GAA AGT | Tài liệu tham khảo [8] |
| Mengo 209 (REV) | GAA GTA ACA TAT AGA CAG ACG CAC AC | Tài liệu tham khảo [8] |
| Mengo 147 (PROBE): | ATC ACA TTA CTG GCC GAA CG | Tài liệu tham khảo [8] |

TCVN 10783-1:2015

Mẫu dò được dán nhãn: tại đầu 5' với 6-carboxyfluorescein (FAM); tại đầu 3' với MGBNFQ (chất kết dính phụ/chất hấp thụ không huỳnh quang).

Bộ mồi này khuếch đại sản phẩm có kích thước 100 bp tương ứng với 110-209 nucleotid của chủng virus mengo tái tổ hợp MC₀ được dùng trong tiêu chuẩn này. Chủng này tương ứng với 110-270 nucleotid của virus mengo không tái tổ hợp phân lập M (số đăng ký Ngân hàng Gen L22089).

Lựa chọn vùng đích để định lượng virus mengo càng giống với HAV càng tốt về cấu trúc, chiều dài và thành phần cơ bản (Tài liệu tham khảo [2]). Các trình tự mồi này không giống bất kỳ trình tự nào khác có sẵn trong Ngân hàng Gen.

Phụ lục D

(Tham khảo)

Sự phát triển của chủng virus mengo MC₀ được dùng để kiểm soát quá trình

D.1 Yêu cầu chung

Virus mengo là một virus murine của họ *Picoraviridae*. Chủng virus mengo MC₀ (ATCC® VR-1597™)²⁾ là một virus tái tổ hợp không có ống poly(C) khi so sánh với virus mengo tự nhiên, có đặc tính phát triển giống với virus tự nhiên nhưng có kiểu hình của vi khuẩn không độc (Tài liệu tham khảo [9]). Chủng này được sử dụng làm virus kiểm soát quá trình trong phương pháp phát hiện HAV và norovirus (Tài liệu tham khảo [2] [7]) và đã được sử dụng làm virus kiểm soát quá trình.

Chủng virus mengo MC₀ là sinh vật biến đổi gen (GMO); cho phép các phòng thử nghiệm sử dụng GMO hoặc sử dụng virus kiểm soát quá trình khác đang được sử dụng.

D.2 Thuốc thử và thiết bị, dụng cụ

D.2.1 Môi trường nuôi cấy tế bào khuyến cáo đối với tế bào HeLa là môi trường thiết yếu tối thiểu của Eagle có 2 mmol/l L-glutamin và BSS của Earle, chỉnh đến 1,5 g/l natri hydrocarbonat, 0,1 mmol/l axit amin không thiết yếu, 1,0 mmol/l natri pyruvat, dung dịch 1× streptomycin/penicillin, 100 ml/l (phát triển) hoặc 20 ml/l (duy trì) huyết thanh phôi thai bò.

D.2.2 Để chuẩn bị nuôi cấy tế bào và phát triển virus, cần có các thiết bị nuôi cấy tế bào cần có: máy ủ có mức CO₂ có thể kiểm soát được và vật liệu nuôi cấy tế bào (bình .v.v.).

D.3 Cách tiến hành

Virus mengo sẽ phát triển trong môi trường (50 ± 10) ml/l CO₂ (bình mở) hoặc môi trường không kiểm soát (bình đóng) trên 80 % đến 90 % lớp đơn suy biến của tế bào HeLa (ATCC® CCL-2™)²⁾ cho đến khi đạt được hiệu ứng tế bào ít nhất là 75 %.

Đưa bình nuôi cấy tế bào vào một chu trình rã đông, sau đó ly tâm lượng chứa trong bình ở 3 000 x g trong (10 ± 1) min.

Giữ lại phần nổi phía trên (nuôi cấy tế bào) để chuẩn bị vật liệu của virus kiểm soát quá trình (5.3.6).

²⁾ ATCC® VR-1597™ và ATCC® CCL-2™ là tên thương mại của sản phẩm được cung cấp từ Viện giữ giống mẫu của Mỹ (American type culture collection). Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu được chứng minh là đáp ứng được các yêu cầu của quy trình.

Phụ lục E
(Tham khảo)

Tách chiết ARN sử dụng hệ thống BioMerieux Nuclisens^{®3)}

E.1 Thuốc thử

E.1.1 Dung dịch đệm lysin BioMerieux Nuclisens[®].

E.1.2 Thuốc thử chiết từ tính BioMerieux Nuclisens[®] (gồm dung dịch silica từ tính, dung dịch đệm rửa 1, 2, 3 và dung dịch đệm rửa giải).

E.2 Thiết bị, dụng cụ

E.2.1 Thiết bị miniMAG hoặc easyMAG BioMerieux Nuclisens[®].

E.2.2 Giá từ tính BioMerieux Nuclisens[®].

E.2.3 Máy ủ lắc nhiệt hoặc thiết bị tương đương để lắc ống 1,5 ml ở $(60 \pm 2) ^\circ\text{C}$ và lắc khoảng 1 400 dao động/min.

E.2.4 Ống có nắp vắn, dung tích 1,5 ml, thích hợp để sử dụng với thiết bị NucliSens[®].

E.3 Cách tiến hành

Cho $(2 \pm 0,1)$ ml dung dịch đệm phân giải NucliSens[®] vào ống. Thêm (500 ± 10) μl mẫu (BMS) hoặc toàn bộ mẫu (các nền mẫu khác) và trộn bằng cách lắc nhẹ.

Ủ trong (10 ± 1) min ở nhiệt độ phòng.

Thêm (50 ± 2) μl dung dịch silica từ tính đã trộn kỹ vào ống và trộn bằng cách lắc nhẹ.

Ủ trong (10 ± 1) min ở nhiệt độ phòng.

Ly tâm (120 ± 10) s ở 1 500 x g sau đó loại bỏ cẩn thận lớp huyền phù phía trên bằng cách, ví dụ: bằng cách hút.

³⁾ BioMerieux NucliSens[®] là tên thương mại của sản phẩm được cung cấp từ BioMerieux. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

Thêm (400 ± 10) μ l dung dịch đệm rửa 1 và hòa lại các hạt nhỏ bằng cách nhỏ giọt hoặc lắc.

Chuyển dung dịch huyền phù vào ống có nắp vặn 1,5 ml. Rửa trong (30 ± 2) s, sử dụng hệ thống chiết miniMAG hoặc easyMAG có các bước rửa tự động. Sau khi rửa, để silica lắng xuống sử dụng khối từ của hệ thống chiết miniMAG hoặc easyMAG. Lấy phần nổi phía trên ra, ví dụ: bằng cách hút.

Tách ống khỏi khối từ, sau đó thêm (400 ± 10) μ l dung dịch đệm rửa 1. Hòa lại các hạt nhỏ, rửa trong (30 ± 2) s, để silica lắng xuống, sử dụng khối từ, sau đó loại bỏ phần nổi phía trên.

Tách ống khỏi khối từ, sau đó thêm (500 ± 10) μ l dung dịch đệm rửa 2. Hòa lại các hạt nhỏ, rửa trong (30 ± 2) s, để silica lắng xuống, sử dụng khối từ, sau đó loại bỏ phần nổi phía trên. Tiến hành lặp lại.

Tách ống khỏi khối từ, sau đó thêm (500 ± 10) μ l dung dịch đệm rửa 3 (mẫu phải không được để trong dung dịch đệm rửa 3 nhiều hơn số lần cần thiết). Rửa trong (15 ± 1) s, để silica lắng xuống, sử dụng khối từ, sau đó loại bỏ phần nổi phía trên.

Thêm (100 ± 2) μ l dung dịch đệm rửa giải. Đậy nắp ống và chuyển vào máy ủ lắc nhiệt hoặc thiết bị tương đương và ủ trong $(5,0 \pm 0,5)$ min ở (60 ± 1) °C và lắc khoảng 1 400 dao động/min.

Đặt ống vào giá từ tính và để silica lắng xuống, sau đó chuyển chất rửa giải vào ống sạch.

Phụ lục F

(Quy định)

Thành phần và cách chuẩn bị thuốc thử và dung dịch đệm**F.1 Dung dịch 5 × PEG/NaCl (PEG 8 000 nồng độ 500 g/l, NaCl 1,5 nồng độ mol/l)****F.1.1 Thành phần**

| | |
|------------------------|--------------|
| Polyetylen (PEG) 8 000 | (500 ± 2) g |
| NaCl | (87 ± 1) g |
| Nước (5.2.1) | theo yêu cầu |

F.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trên trong (450 ± 5) ml nước (5.2.1), gia nhiệt nhẹ nếu cần. Chính thể tích đến (1 000 ± 10) ml bằng nước và trộn kỹ. Khử trùng bằng hấp áp lực.

F.2 Hỗn hợp cloroform/butanol**F.2.1 Thành phần**

| | |
|-----------|---------------|
| Cloroform | (10 ± 0,1) ml |
| Butanol | (10 ± 0,1) ml |

F.2.2 Chuẩn bị

Trộn các thành phần trên với nhau.

F.3 Dung dịch proteinase K**F.3.1 Thành phần**

| | |
|------------------------|---------------|
| Proteinase K (30 U/mg) | (20 ± 0,1) mg |
| Nước (5.2.1) | (200 ± 2) ml |

F.3.2 Chuẩn bị

Hòa tan proteinase K trong nước. Trộn kỹ.

Bảo quản với các lượng để sử dụng ở $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ trong tối đa 6 tháng. Khi được rã đông, bảo quản ở $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ và dùng trong 1 tuần.

F.4 Muối đệm phosphat (PBS)**F.4.1 Thành phần**

| | |
|-----------------------|-----------------------------|
| NaCl | $(8,0 \pm 0,1) \text{ g}$ |
| Kali clorua | $(0,2 \pm 0,01) \text{ g}$ |
| Dinatri hydrophosphat | $(1,15 \pm 0,01) \text{ g}$ |
| Kali dihydrophosphat | $(0,2 \pm 0,01) \text{ g}$ |
| Nước (5.2.1) | $(1\ 000 \pm 2) \text{ ml}$ |

F.4.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trên trong nước, chỉnh đến pH $7,3 \pm 0,2$ ở $25 ^\circ\text{C}$, nếu cần. Khử trùng bằng hấp áp lực, nếu cần.

F.5 Đệm Tris/glyxin/chất chiết thịt bò (TGBE)**F.5.1 Thành phần**

| | |
|---------------------------------------------------|-----------------------------|
| Tris base [<i>tris</i> (hydroxymetyl)aminometan] | $(12,1 \pm 0,2) \text{ g}$ |
| Glyxin | $(3,8 \pm 0,1) \text{ g}$ |
| Chất chiết thịt bò | $(10 \pm 0,1) \text{ g}$ |
| Nước (5.2.1) | $(1\ 000 \pm 1) \text{ ml}$ |

F.5.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trên trong nước, chỉnh đến pH $9,5 \pm 0,2$ ở $25 ^\circ\text{C}$, nếu cần. Khử trùng bằng hấp áp lực, nếu cần.

Phụ lục G
(Tham khảo)

Quá trình tạo các gốc kiểm soát ADN mạch kép (dsADN)

G.1 Yêu cầu chung

Các plasmid đối chứng được tạo thành bằng cách gắn trình tự ADN đích vào một vector plasmid thích hợp sao cho trình tự đích là xuôi của trình tự xúc tác đối với ARN polymerase.

G.2 Thuốc thử và thiết bị, dụng cụ

G.2.1 Các tế bào khả biến chủng JM109.

G.2.2 Canh thang LB, Bacto trypton⁴⁾ 10 g/l, cao nấm men 5 g/l, NaCl 10 g/l, chỉnh đến pH 7,0.

G.2.3 Thạch LB, canh thang LB bổ sung thạch 15 g/l.

G.2.4 Ampicillin.

G.2.5 Thuốc thử plasmid miniprep

G.2.6 Đá.

G.2.7 Máy ủ, có thể vận hành ở $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

G.2.8 Máy ủ lắc hoặc tương đương, vận hành ở $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ và khoảng 160 dao động/min.

G.3 Phiên mã

Thêm 1 ng đến 100 ng vật liệu kiểm soát dsADN đã tinh sạch trước vào các tế bào khả biến chủng JM109 ($50 \pm 0,5$) μl và trộn kỹ. Làm lạnh trên đá trong (20 ± 1) min.

Ủ ở $(42 \pm 1)^\circ\text{C}$ trong (45 ± 2) s sau đó làm lạnh ngay trên đá trong (120 ± 10) s.

Thêm (950 ± 10) μl canh thang LB vào các giếng sau đó lắc ở $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ khoảng 160 dao động/min trong (90 ± 10) min.

Gạt (100 ± 2) μl canh thang đã ủ lên đĩa thạch LB có bổ sung 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin.

Ủ đĩa ở $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ qua đêm, kiểm tra sự phát triển của các khuẩn lạc, sau đó bảo quản ở $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ cho đến khi cần để tinh sạch ADN plasmid.

⁴⁾ Bacto trypton là sản phẩm có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng.

G.4 Tinh sạch ADN plasmid

Ủ ($5 \pm 0,1$) ml canh thang LB bổ sung 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilin có khuẩn lạc đơn lẻ chứa plasmid quan tâm.

Ủ ở (37 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ qua đêm.

Tinh sạch ADN plasmid từ dịch nuôi cấy sử dụng thuốc thử miniprep theo quy trình thích hợp; rửa giải trong (100 ± 2) μl đệm rửa giải.

Bảo quản gốc ADN plasmid ở (-20 ± 5) $^{\circ}\text{C}$ cho đến khi cần để chuẩn bị vật liệu kiểm soát dsADN (5.3.8).

G.5 Định lượng ADN plasmid

Sử dụng máy đo quang phổ xác định độ hấp thụ của gốc plasmid ở 260 nm.

Nhân độ hấp thụ đọc được với 5×10^{-8} để cho nồng độ của ADN, tính bằng gam trên microlit.

Chia số này cho khối lượng phân tử plasmid đơn lẻ, tính bằng gam, để tính nồng độ của ADN, tính bằng số bản sao trong một microlit.

Khối lượng của từng phân tử plasmid có thể tính được bằng cách nhân chiều dài plasmid trong cặp bazơ với 607,4 (khối lượng phân tử tương đối của cặp bazơ trung bình) và chia cho hệ số Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$), ví dụ: plasmid kích thước 3 000 bp có khối lượng là $3,02 \times 10^{-18}$ g.

Phụ lục H

(Tham khảo)

Quá trình tạo các gốc ARN kiểm soát bên ngoài (EC ARN)

H.1 Yêu cầu chung

Các plasmid kiểm soát được tạo thành bằng cách thất trình tự ADN đích thành một vector plasmid thích hợp sao cho trình tự đích là xuôi của trình tự xúc tác đối với ARN polymerase.

H.2 Thuốc thử và thiết bị, dụng cụ

H.2.1 Enzym giới hạn dùng để tạo tuyến tính và các dung dịch đệm kết hợp.

H.2.2 Thuốc thử tinh sạch PCR.

H.2.3 Thuốc thử chuyển hóa *In vitro* ARN (ARN polymerase, NTP, dung dịch đệm .v.v...)

H.2.4 DNase không chứa RNase.

H.2.5 Thuốc thử tinh sạch ARN

H.2.6 Thuốc thử và thiết bị điện di trên gel ADN.

H.2.7 Thuốc thử và thiết bị real-time RT-PCR một bước (sử dụng mẫu dò thủy phân).

H.2.8 Tủ ấm, có thể duy trì ở $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$

H.3 Tạo tuyến tính ADN plasmid

Cho 100 ng đến 500 ng ADN plasmid kiểm soát đã tinh sạch vào hỗn hợp phản ứng chứa enzym giới hạn thích hợp (để có tuyến tính plasmid ở điểm bắt đầu xuôi của trình tự đích) và các dung dịch đệm theo khuyến cáo của nhà sản xuất enzym.

Ủ ở $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ trong (120 ± 5) min.

Tinh sạch ADN từ hỗn hợp mastermix sử dụng thuốc thử tinh sạch PCR, rửa giải trong $(50 \pm 0,5)$ μl dung dịch đệm rửa giải.

Kiểm tra độ tuyến tính sử dụng điện di gel (so sánh chất lỏng được tinh sạch đã tuyến tính với plasmid không tuyến tính).

H.4 Phiên mã ARN *in vitro*

Cho 100 ng đến 500 ng plasmid ADN tuyến tính đã tinh sạch vào hỗn hợp phản ứng phiên mã ARN *in vitro* đã chuẩn bị theo khuyến cáo của nhà sản xuất enzym ARN polymerase .

Ủ ở $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ trong (120 ± 5) min.

Tinh sạch ARN sử dụng thuốc thử tinh sạch ARN, rửa giải trong (100 ± 1) μl nước (5.2.1).

H.5 Kiểm tra việc nhiễm ADN

Chuẩn bị hỗn hợp mastermix real-time RT-PCR đích đặc hiệu (5.3.7), tách thành hai phần và bất hoạt enzym RT trong một phần bằng cách gia nhiệt ở $(95 \pm 2) ^\circ\text{C}$ trong $(5,0 \pm 0,5)$ min.

Dùng cả hai phần hỗn hợp mastemix phụ thuộc EC ARN gốc vào real-time RT-PCR dọc theo dãy dịch pha loăng dsADN làm đường chuẩn (8.4).

Nếu mức có thể phát hiện được trong phần EC ARN gốc được thử nghiệm với hỗn hợp mastemix đã xử lý nhiệt lớn hơn 0,1 % so với mức trong phần mẫu thử với hỗn hợp mastermix chưa xử lý nhiệt (nếu chênh lệch C_q giữa EC ARN gốc được thử với hỗn hợp mastermix xử lý nhiệt và hỗn hợp mastermix chưa xử lý nhiệt nhỏ hơn 10 đối với đường chuẩn dsADN có độ dốc lý tưởng $-3,32$) thì EC ARN gốc bị nhiễm ADN và phải được xử lý lại bằng DNase (1.3). Nếu mức phát hiện nhỏ hơn 0,1 % thì bảo quản ở $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ cho đến khi cần để chuẩn bị vật liệu kiểm soát EC ARN (5.3.8).

H.6 Định lượng EC ARN

Sử dụng máy đo quang phổ xác định độ hấp thụ của EC ARN gốc đã xử lý DNase ở bước sóng 260 nm.

Nhân độ hấp thụ đọc được với 4×10^{-8} để được nồng độ của ARN, tính bằng gam trên microlit.

Chia số này cho khối lượng phân tử EC ARN đơn lẻ, tính bằng gam, để tính nồng độ ARN, tính bằng số bản sao trong một microlit.

Khối lượng của từng phân tử ARN có thể tính được bằng cách nhân chiều dài ARN trong ribonucleotid với 320,5 (khối lượng phân tử tương đối trung bình của ribonucleotid) và chia cho hệ số Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$), ví dụ: phân tử ARN của 200 ribonucleotid có khối lượng là $1,06 \times 10^{-19}$ g.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] BOOM R., SOL C.J., SALIMANS M.M., JANSEN C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN P.M., VAN DER NOORDAA J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990, **28**pp. 495-503.
- [2] COSTAFREDA M.I., BOSCH A., PINTÓ R.M. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, **72**pp. 3846-3855.
- [3] dA SILVA A.K., LE SAUX J.C., PARNAUDEAU S., POMMEPUY M., ELIMELECH M., LE GUYADER F.S. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: Different behaviors of genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, **73**pp. 7891-7897.
- [4] SVRAKA S., DUIZER E., VENNEMA H., dE BRUIN E., VAN DER VEER B., DORRESTEIJN B. et al. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J. Clin. Microbiol.* 2007, **45**pp. 1389-1394.
- [5] LOISY F., ATMAR R.L., GUILLON P., LE CANN P., POMMEPUY M., LE GUYADER F.S. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J. Virol. Methods.* 2005, **123**pp. 1-7.
- [6] KACEYAMA T., KOJIMA S., SHINOHARA M., UCHIDA K., FUKUSHI S., HOSHINO F.B. et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2003, **41**pp. 1548-1557.
- [7] LE GUYADER F.S., PARNAUDEAU S., SCHAEFFER J., BOSCH A., LOISY F., POMMEPUY M. et al. Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, **75**pp. 618-624.
- [8] PINTO R.M., COSTAFREDA M.I., BOSCH A. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, **75**pp. 7350-7355.
- [9] MARTIN L.R., DUKE G.M., OSORIO J.E., HALL D.J., PALMENBERG A.C. Mutational analysis of the mengovirus poly(C) tract and surrounding heteropolymeric sequences. *J. Virol.* 1996, **70**pp.2027-2031.
- [10] 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.*
- [11] ISO 22118, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens – Performance characteristics.*
- [12] ISO 22119, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions.*