

TCVN 7682 : 2007

ISO 20838 :2 006

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI –
PHẢN ỨNG CHUỖI POLYMERAZA (PCR) ĐỂ PHÁT HIỆN SINH
VẬT GÂY BỆNH TỪ THỰC PHẨM – YÊU CẦU VỀ KHUẾCH
ĐẠI VÀ PHÁT HIỆN ĐỐI VỚI CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR)
for the detection of food-borne pathogens – Requirements for amplification
and detection for qualitative methods*

HÀ NỘI – 2007

Lời nói đầu

TCVN 7682 : 2007 hoàn toàn tương đương với ISO 20838 : 2006;

TCVN 7682 : 2007 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Việc khuếch đại và phát hiện các trình tự axit nucleic đích được tiến hành để xác định sự có mặt hay không có mặt các trình tự axit nucleic nhất định trong phần mẫu thử. Việc xác định này liên quan đến các kiểm chứng và nằm trong giới hạn phát hiện của phương pháp phân tích được sử dụng và phần mẫu thử được phân tích.

Tiêu chuẩn này mô tả qui trình phát hiện các vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm, bao gồm các sinh vật gây bệnh, bằng cách phân tích các axit nucleic tách chiết được từ các mẫu thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, môi trường sản xuất, hoặc từ các dịch cấy hoặc huyền phù tế bào được chuẩn bị từ thực phẩm. Các qui trình thích hợp về chuẩn bị mẫu, nuôi cấy vi sinh và tách chiết axit nucleic được mô tả trong ISO 20837.

Mục đích của tiêu chuẩn này là các phương pháp khuếch đại dựa trên phản ứng chuỗi (PCR). Tuy nhiên, trong lĩnh vực này tốc độ phát triển công nghệ rất nhanh, các công nghệ khuếch đại và phương pháp phát hiện khác có thể được cân nhắc.

Tiêu chuẩn này liên quan đến một loạt các tiêu chuẩn và Yêu cầu kỹ thuật dưới tên chung *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) để phát hiện sinh vật gây bệnh từ thực phẩm*.

- *Yêu cầu chung và định nghĩa (ISO 22174);*
- *Yêu cầu về chuẩn bị mẫu để phát hiện định tính (ISO 20837)*
- *Kiểm tra tính năng về chu kỳ nhiệt (ISO/TS 20836)*
- *Yêu cầu về khuếch đại và phát hiện đối với các phương pháp định tính (ISO 20838).*

**Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi –
Phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) để phát hiện sinh vật
gây bệnh từ thực phẩm – Yêu cầu về khuếch đại và
phát hiện đối với các phương pháp định tính**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR)
for the detection of food-borne pathogens – Requirements for amplification
and detection for qualitative methods*

CẢNH BÁO – Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. 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 qui định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra một hệ thống toàn diện về các phương pháp định tính để phát hiện sinh vật gây bệnh trong thực phẩm sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR).

Tiêu chuẩn này cũng đưa ra những yêu cầu chung đối với việc khuếch đại các trình tự axit nucleic (ADN), phát hiện và khẳng định việc nhận dạng các trình tự axit nucleic (ADN) đã được khuếch đại.

Thực hiện đúng các hướng dẫn, yêu cầu tối thiểu và đặc tính mô tả trong tiêu chuẩn này để thu được các kết quả tái lập và các kết quả đó có thể so sánh được trong các phòng thử nghiệm khác nhau.

Tiêu chuẩn này được thiết lập để phát hiện các vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm hoặc để phát hiện các vi sinh vật khác cần nghiên cứu có trong thực phẩm hoặc được tách ra từ chất nền thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và cũng có thể áp dụng cho các loại chất nền khác, ví dụ: mẫu được lấy từ môi trường.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

ISO16140, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods* (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Thủ tục đánh giá xác nhận các phương pháp thay thế)

ISO 22174 : 2005 *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 – Yêu cầu chung và định nghĩa).

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng các thuật ngữ và định nghĩa trong ISO 22174.

4 Nguyên tắc

Phân tích định tính bao gồm sàng lọc và/hoặc phát hiện đặc hiệu các trình tự axit nucleic đích trong mẫu thử. Tính đặc thù có thể ở mức giống, loài hoặc ở mức phân loại (taxon) thấp hơn.

Kết quả định tính phải nêu rõ sự có mặt hay không có mặt trình tự đích đang nghiên cứu, liên quan đến các phép kiểm chứng thích hợp và nằm trong giới hạn phát hiện của phương pháp được sử dụng và phần mẫu cần phân tích.

Phép phân tích nhìn chung bao gồm:

- a) khuếch đại các trình tự đích đặc hiệu bằng PCR;
- b) phát hiện các sản phẩm PCR;
- c) khẳng định việc nhận dạng của sản phẩm PCR và/hoặc;
- d) khẳng định bằng phương pháp cấy vi sinh vật chuẩn (ví dụ: tiêu chuẩn quốc tế).

5 Thuốc thử

Trong mọi trường hợp, chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích thích hợp cho các ứng dụng sinh học phân tử. Nhìn chung, nên lấy các lượng cần thiết của các dung dịch phản ứng cho phép thử PCR và bảo quản chúng trong các điều kiện thích hợp, ví dụ: ở nhiệt độ -20 °C.

5.1 ADN polymeraza

Polymeraza chịu nhiệt (có thể bao gồm hoạt tính transcriptaza phiên mã ngược) được dùng cho PCR. Polymeraza chịu nhiệt có thể đã được tinh sạch, emzym tự nhiên, hoặc dạng emzym kết hợp của công nghệ gen đã được tinh sạch.

Sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Mỗi một ADN polymeraza có thể cần đến các điều kiện thực nghiệm khác nhau, ví dụ: dung dịch đệm, nhiệt độ.

5.2 Transcriptaza phiên mã ngược

Emzym này được sử dụng để sao chép ARN trong ADN (cADN) đơn bội bổ sung có thể khuếch đại bằng các PCR tiếp theo.

Sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

5.3 Dung dịch đệm phản ứng

Dung dịch đệm thích hợp cần sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các thuốc thử đã chuẩn bị sẵn có bán sẵn trên thị trường. Các vật liệu được dùng để chuẩn bị dung dịch đệm PCR phải ổn định ở điều kiện bảo quản và điều kiện chu trình nhiệt.

Sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

5.4 Dung dịch deoxyribonucleosit triphosphat (dNTP) cho PCR

Cần sử dụng các dung dịch chứa dATP, dCTP, dGTP, dTTP và/hoặc dUTP loại sinh học phân tử thích hợp. Các dung dịch này phải bền trong quá trình bảo quản và trong các điều kiện PCR. Các dung dịch này có bán sẵn trên thị trường.

5.5 Môi

Môi được chọn dựa theo trình tự đặc biệt để phát hiện ADN của vi sinh vật đích.

5.6 Nước

Đối với phản ứng khuếch đại, chỉ sử dụng nước không chứa DNaza và RNaza. Nước tinh khiết thích hợp có bán sẵn trên thị trường.

5.7 Magie clorua ($MgCl_2$)

Muối này là một thành phần của dung dịch đệm phản ứng hoặc dung dịch tách chiết.

5.8 Hóa chất để phát hiện các sản phẩm PCR

Hóa chất được dùng cho hệ thống phát hiện được mô tả trong phương pháp PCR phải có chất lượng phù hợp.

5.9 Các thuốc thử bổ sung tùy chọn

5.9.1 Dầu khoáng

Loại dầu này được pha vào hỗn hợp phản ứng để giảm sự bay hơi trong chu trình nhiệt.

5.9.2 Chất xúc tác

Các chất như polyetylen glycol hoặc albumin huyết thanh bò có thể được bổ sung vào phản ứng PCR để giảm ức chế do các chất nền [1] gây ra.

5.9.3 Chất ức chế RNaza

Các chất này được bổ sung vào RT-PCR để tránh việc suy giảm chất lượng của ARN đích do enzym RNaza gây ra, mà có thể làm nhiễm bẩn thuốc thử hoặc dụng cụ bằng chất dẻo trong qui trình tách chiết. Các chất ức chế này có bán sẵn trên thị trường.

5.9.4 Thuốc thử để ngăn ngừa việc lây nhiễm từ các sản phẩm PCR

Để tránh làm nhiễm bẩn tiếp theo, hệ thống khử nhiễm (ví dụ: dựa vào psoralen, dUTP và UNG) có thể bao gồm trong hệ thống PCR để giảm thiểu nguy cơ lây nhiễm từ các sản phẩm PCR được tạo ra trong các phản ứng PCR trước đó.

6 Thiết bị và dụng cụ

Theo ISO 22174.

Ngoài thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm chuẩn, cần sử dụng các loại sau đây:

6.1 Máy chu trình nhiệt, có thể thực hiện chính xác và lặp lại chu trình thời gian và nhiệt độ được mô tả trong phương pháp PCR.

6.2 Pipet, có đầu lọc

Cần đến ít nhất ba bộ pipet, mỗi một bộ dành riêng cho:

- chuẩn bị mẫu;
- chuẩn bị hỗn hợp chính;
- các bước sau khuếch đại.

CHÚ THÍCH: Sử dụng các đầu tip lọc là không cần thiết đối với các bước sau khuếch đại.

6.3 Ống phản ứng, thích hợp cho việc sử dụng trong chu trình nhiệt và có thể chịu được đốt nóng nhiều lần đến 100 °C và làm nguội đến 4 °C mà không bị hư hỏng.

6.4 Hệ thống phát hiện các sản phẩm PCR, bao gồm:

- a) thiết bị điện di gel polyacrylamit hoặc agarosa, và nguồn bức xạ UV để ghi hình ảnh ADN đã khuếch đại, nếu cần, hoặc
- b) thiết bị sắc ký cột axit nucleic và hệ thống phát hiện thích hợp, hoặc
- c) pha rắn có lắp đầu dò đặc hiệu và thiết bị để phát hiện các sản phẩm PCR, hoặc
- d) các hệ thống thích hợp khác tương đương.

7 Cách tiến hành

7.1 Khuếch đại bằng PCR

Việc khuếch đại một trình tự axit nucleic có thể xảy ra trong ống nghiệm thông qua phản ứng xúc tác bởi enzym ADN polymeraza với sự có mặt của cặp mỗi oligonucleotit và các deoxyribonucleosit triphosphat trong dung dịch đệm phản ứng nhất định. Điều kiện quyết định thành công của phản ứng khuếch đại một trình tự đích là hỗn hợp phản ứng không chứa các chất ức chế ADN polymeraza. Khuếch đại các đoạn ADN này tiến hành theo chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm các bước sau:

- a) làm biến tính sợi ADN đôi thành sợi axit nucleic đơn bằng nhiệt;
- b) mỗi kết cặp với trình tự đích trên cả hai sợi đơn ADN ở nhiệt độ thích hợp và
- c) phản ứng kéo dài các sợi đã bám với deoxyribonucleosit triphosphat bởi ADN polymeraza ở nhiệt độ thích hợp.

Có thể sử dụng PCR để phát hiện ARN nếu trình tự đã được sao chép vào trình tự ADN bằng transcriptaza phiên mã ngược.

7.2 Phát hiện và/hoặc khẳng định sản phẩm PCR

Các sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di gel hoặc bằng một phương pháp thích hợp. Kích thước của sản phẩm PCR có thể được ước tính bằng so sánh dựa vào sản phẩm PCR kiểm chứng dương tính và ADN thích hợp có độ dài chuẩn.

Trong trường hợp phân tích bằng phương pháp PCR tức thời (real-time PCR), thì việc khuếch đại và phát hiện diễn ra đồng thời.

Khẳng định việc nhận dạng sản phẩm PCR cần được thực hiện bằng phương pháp thích hợp, ngoài việc xác định kích cỡ, ví dụ như:

- a) bằng trình tự ADN của sản phẩm PCR;
- b) bằng cách lai sản phẩm PCR với đầu dò ADN đặc hiệu;
- c) bằng cách phân tích giới hạn của sản phẩm PCR; chiều dài của đoạn này sau khi cắt giới hạn phải tương ứng với chiều dài của trình tự ADN đích sau khi giới hạn.

Kết quả dương tính có thể cần phải khẳng định bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy vi sinh chuẩn và được khẳng định như mô tả trong các tiêu chuẩn thích hợp.

7.3 Các phép kiểm chứng

Chất lượng, tính nguyên vẹn và lượng ADN khuôn có ảnh hưởng đến kết quả của PCR vì thế ảnh hưởng đến kết quả phân tích.

Vì có những nguy cơ có kết quả dương tính giả và/hoặc âm tính giả nên khi tiến hành PCR phải cần đến các phép kiểm chứng thích hợp. Tần suất sử dụng phải được xác định như một phần của chương trình đảm bảo chất lượng của phòng thử nghiệm. Vận hành PCR cần sử dụng phép kiểm chứng khuếch đại bên ngoài hoặc bên trong.

Cần sử dụng các mẫu chuẩn và dịch cấy chuẩn làm kiểm chứng âm và kiểm chứng dương, nếu sẵn có và thích hợp.

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các chất kiểm chứng được nêu trong 9.3 và bảng 1 của ISO 22174:2005.

7.4 Xem xét chung về phản ứng khuếch đại

Các điều kiện phản ứng và chu trình nhiệt phải được tối ưu hóa cho mỗi cặp mồi và/hoặc cho mỗi hệ thống. Đối với bất kỳ PCR nào khi sử dụng lần đầu trên dịch chiết và huyền phù thu được từ chất nền cụ thể, thì cần phải cho thấy các điều kiện phản ứng là thích hợp để đạt được giới hạn phát hiện mong muốn. Giới hạn phát hiện PCR là lượng tối thiểu ADN đích cần đến để thu được một tín hiệu. Trong một phản ứng tối ưu, chỉ cần dưới 40 chu trình nhiệt là đã có thể nhận được sản phẩm PCR với lượng có thể phát hiện được bằng phương pháp chuẩn. PCR tối ưu, thì trong 40 chu trình nhiệt hoặc ít hơn phải có thể khuếch đại được đủ số bản sao của sản phẩm PCR có thể phát hiện được. Nếu được, có thể thì nên từ khoảng 100 bản sao của AND khuôn tinh khiết. Phải chứng minh được sự không có mặt của chất ức chế PCR bằng cách sử dụng các kiểm chứng như trong ISO 22174.

Nhìn chung, tính đặc hiệu của phản ứng càng tăng nhiều càng tốt, ví dụ: bằng cách sử dụng PCR bắt đầu với nhiệt độ cao (hot-start PCR). Hot-start PCR là phương pháp làm tăng tính đặc hiệu bằng cách làm giảm các phản ứng phụ như việc khuếch đại các trình tự không mong muốn trong ADN nền (hiện tượng bắt cặp sai của mồi) và hiện tượng oligo hoá mồi.

7.5 Thiết kế mồi

Do tính năng của mồi PCR đặc hiệu cần được so sánh với các PCR đặc hiệu khác, nên cần phải tính đến một số khía cạnh thiết kế sau đây.

Trình tự mồi tốt nhất nên có những đặc điểm sau đây khi có thể:

- chiều dài của từng mồi: từ 18 nucleotit đến 30 nucleotit;
- tỷ lệ GC:AT = 50:50, nếu có thể, nếu không thì càng sát với tỷ lệ đó càng tốt;
- không tập trung nhiều các G và C vào một đoạn ngắn của mồi (tính ổn định ở bên trong mồi cao);
- đầu 3' của mồi tránh hiện tượng kết cặp bổ sung để tạo các cặp đôi (dimer) giữa hai mồi;
- không có cấu trúc bậc hai bên trong;
- không tạo thành cặp đôi với mồi hoặc mẫu dò (probe) được dùng trong PCR.

Hiện nay có các phần mềm có sẵn phục vụ cho thiết kế mồi.

7.6 Kiểm tra tính đặc hiệu của mồi

7.6.1 Khái quát

Khả năng phát hiện trình tự đích của mồi phải được đánh giá xác nhận.

Việc đánh giá xác nhận mồi phải được tiến hành theo hai bước: đầu tiên đánh giá lý thuyết, sau đó là đánh giá bằng thực nghiệm.

7.6.2 Đánh giá bằng lý thuyết

Việc đánh giá bằng lý thuyết phải được tiến hành bằng so sánh trình tự tương đồng (ví dụ: tìm bằng công cụ trong FastA, Blast) với một trong số các trình tự trong ngân hàng trình tự axit nucleic (ví dụ: trong EMBL, GenBank).

7.6.3 Đánh giá tính đặc hiệu bằng thực nghiệm

Không phụ thuộc vào các tiêu chí thiết kế đã áp dụng, mà tính đặc hiệu của mồi luôn phải được kiểm tra bằng thực nghiệm để xác định khả năng của mồi phân biệt được trình tự đích với các loài/chủng của các trình tự vi sinh vật gần giống với trình tự đích và các kiểm chứng âm tính. ISO 16140 qui định các điểm cần xem xét khi chọn các chủng.

8 Diễn giải kết quả

Các kết quả thu được, bao gồm các kiểm chứng qui định trong ISO 22174, cần phải rõ ràng và có kết quả như mong muốn, nếu không thì phải tiến hành lặp lại.

Kết quả PCR sẽ là một trong hai trường hợp sau:

TCVN 7682 : 2007

- a) dương tính nếu chỉ thấy một sản phẩm PCR đặc hiệu được phát hiện và tất cả các phép kiểm chứng đều có kết quả như mong đợi, hoặc
- b) âm tính trong các giới hạn phát hiện nếu không phát hiện thấy sản phẩm PCR đặc hiệu và tất cả các phép kiểm chứng đều có kết quả như mong đợi.

9 Tính năng

Các thuật ngữ được nêu trong ISO 22174.

Phương pháp PCR cần được kiểm tra bằng liên phòng thử nghiệm hoặc trong một phòng thử nghiệm để xác định các đặc trưng thực hiện.

Giới hạn phát hiện của phương pháp PCR về vi sinh vật mà không phải là virus cần được xác định bởi phương pháp thích hợp, xem [2].

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải được ghi phù hợp với ISO 22174.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] BICKLEY and HOPKINS: *Inhibitors and enhancers of PCR in Analytical Molecular Biology: Quality and Validation*, Saunders, G.S and Parkes, H.C (eds: RSC publications, 1999, U.K
- [2] KNUTSSON, R., BLIXT, Y., GRAGE, H., BORCH, E. and RADSTROM, P. Evaluation of selective enrichment PCR procedures for *Yersinia enterocolitica*. *International Journal of Food Microbiology*, **73**, 2002, pp. 35-46.
- [3] ISO/TS 20836, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Performance testing for thermal cyclers*.
- [4] ISO 20837, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Requirements for sample preparation for quantitative detection*.
-