

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 12363:2018**

**ISO 18744:2016**

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG CHUỖI THỰC PHẨM –  
PHÁT HIỆN VÀ ĐẾM CRYPTOSPORIDIUM VÀ  
GIARDIA TRONG RAU TƯƠI ĂN LÁ VÀ QUẢ MỌNG**

*Microbiology of the food chain - Detection and enumeration of  
Cryptosporidium and Giardia in fresh leafy green vegetables and berry  
fruits*

HÀ NỘI - 2018

**Lời nói đầu**

TCVN 12363:2018 hoàn toàn tương đương với ISO 18744:2016;

TCVN 12363:2018 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.

## Lời giới thiệu

*Cryptosporidium* spp. và *Giardia duodenalis* (đồng nghĩa: *G. lamblia*, *G. intestinalis*) là những đơn bào ký sinh có thể gây bệnh đường ruột ở người. Cả hai sinh vật này được đặc trưng bởi một giai đoạn chuyển tiếp mạnh, kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* có thể tồn tại một thời gian dài trong môi trường ẩm ướt. Các giai đoạn chuyển tiếp này được gọi chung là các bào nang. Kén hợp tử *Cryptosporidium* đặc biệt có khả năng chịu được clo ở nồng độ cao được sử dụng để xử lý nước uống và việc khử trùng hóa học trong quá trình chế biến đối với rau tươi ăn lá và quả mọng có thể không có hiệu quả. Do đó, với sự không có mặt các tế bào sinh dưỡng chỉ thị cho sự nhiễm bẩn phân trên rau tươi ăn lá hoặc quả mọng không có nghĩa là không có mặt các kén hợp tử. Thực tế, không có phương pháp nuôi cấy để phát hiện *Cryptosporidium* spp. và *Giardia duodenalis*, do đó để phát hiện nhiễm các ký sinh trùng này, phải tách trực tiếp bào nang ra khỏi mẫu thực phẩm, sau đó soi các bào nang này bằng kính hiển vi. Các phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này nhằm xác định các kén hợp tử *Cryptosporidium* và/hoặc bào nang *Giardia* trên bề mặt sản phẩm tươi và định lượng chúng.

## Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phát hiện và đếm *Cryptosporidium* và *Giardia* trong rau tươi ăn lá và quả mọng

*Microbiology of the food chain – Detection and enumeration of Cryptosporidium and Giardia in fresh leafy green vegetables and berry fruits*

**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 áp dụng để phát hiện và đếm các kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* có trên bề mặt hoặc bên trong sản phẩm thực phẩm, thực phẩm trong tài liệu này là rau tươi ăn lá và quả mọng. Với sự kiểm soát thích hợp, phương pháp này cũng có thể áp dụng cho việc kiểm tra các sản phẩm tươi khác.

Các mô tả hiển vi về các kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia duodenalis* có kích thước trong phạm vi bao gồm các loài (*Cryptosporidium*) hoặc tập hợp các loài (*Giardia*) được biết là các loài gây bệnh cho người.

Phương pháp này không sử dụng phép phân tích phân tử và do đó không thích hợp để xác định các loài hoặc các kiểu gen/tập hợp các kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia*. Phương pháp này phát hiện được tất cả các loài và kiểu gen/tập hợp loài đã biết là gây bệnh và không gây bệnh cho người. Để tiếp tục nhận dạng chúng, cần phân tích hóa phân tử. Tuy nhiên, việc này cũng không thể thực hiện được một cách tin cậy, nếu như trước đó đã thêm mẫu kiểm chứng dương vào mẫu thử, vì khi đó kết quả của phép phân tích hóa phân tử sẽ bị nhiễu.

Tiêu chuẩn này không cho phép xác định khả năng sống hoặc khả năng lây nhiễm của bất kỳ kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* nào nếu có mặt.

## 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).

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*

## 3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

### 3.1

**Kén hợp tử *Cryptosporidium*** (*Cryptosporidium* oocyst)

Giai đoạn chuyển tiếp của các loài *Cryptosporidium* spp.

CHÚ THÍCH: Việc phát hiện chúng dựa trên phản ứng với kháng thể kháng *Cryptosporidium* đặc hiệu và các đặc điểm hình thái như được mô tả trong Điều 8.

### 3.2

**Bào nang *Giardia*** (*Giardia* cysts)

Giai đoạn chuyển tiếp của các loài *Giardia* spp.

CHÚ THÍCH: Việc phát hiện ra chúng dựa trên phản ứng với kháng thể kháng *Giardia* đặc hiệu và các đặc điểm hình thái được mô tả trong Điều 8.

### 3.3

**Rau tươi ăn lá** (fresh leafy green vegetable)

Lá cây dùng làm thức ăn mà không cần qua chế biến, trừ việc có thể rửa và cắt.

### 3.4

**Quả mọng tươi** (fresh berry fruit)

Trái cây nhỏ, tròn hoặc thuôn, tươi và mọng nước mà không qua chế biến, trừ việc có thể rửa và cắt.

### 3.5

**Kiểm soát chiết tách nội chuẩn** (internal extraction control)

Việc cho thêm một lượng nhất định các kén hợp tử (bào nang) đã được đánh dấu bằng chất phát huỳnh quang đặc hiệu, để bảo đảm hiệu quả của phương pháp xác định.

### 3.6

**Kiểm chứng dương** (positive control)

Mẫu được cho một lượng đã định các kén hợp tử (bào nang) trước khi chiết để bảo đảm hiệu quả của phương pháp sau khi tách rửa.

## 3.7

**Kiểm chứng âm (negative control)**

Mẫu có số lượng chất liệu tương đương với mẫu thử, mẫu này được cho là không chứa các kén hợp tử (bào nang) và được xử lý theo đúng quy trình như đã xử lý mẫu thử.

**4 Nguyên tắc**

Nguyên lý của phương pháp dựa trên việc loại bỏ các kén hợp tử (bào nang) ra khỏi mẫu bằng các quy trình tách rửa, sau đó tách rửa bằng máy ly tâm để lắng cặn và phân tách bằng kỹ thuật tách từ miễn dịch (IMS). Tiến hành phát hiện các kén hợp tử (bào nang) bằng kính hiển vi sau khi đã đánh dấu bằng các kháng thể đơn dòng đặc hiệu (mAbs) có kết hợp với chất phát huỳnh quang.

**5 Thuốc thử****5.1 Thuốc thử cần để tách các kén hợp tử (bào nang) ra khỏi rau tươi ăn lá và quả mọng**

5.1.1 Đệm glyxin, pH 5,5 dùng cho rau tươi ăn lá (A.2.1).

5.1.2 Đệm glyxin, pH 3,5 dùng cho quả mọng (A.2.2).

**5.2 Thuốc thử cần để cô đặc, cố định, nhuộm, phát hiện và kiểm tra chất lượng**

5.2.1 Metanol, loại phân tích.

5.2.2 Hạt thuận từ (thuận từ beads), gắn các kháng thể đặc hiệu với lớp vỏ của kén hợp tử *Cryptosporidium* và/hoặc bào nang *Giardia*.

5.2.3 Axit clohydric (HCl), 0,1 mol/l (A.3.1).

5.2.4 Natri hydroxit (NaOH), 1 mol/l (A.3.2).

5.2.5 Kháng thể đơn dòng đã đánh dấu phát huỳnh quang (mAbs), kháng lại kén hợp tử *Cryptosporidium* và/hoặc bào nang *Giardia*.

5.2.6 Môi trường kết nối (gắn) miễn dịch huỳnh quang (A.3.3).

5.2.7 Thuốc thử 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid ngâm hai phân tử nước (DAPI), dạng đông khô.

5.2.8 Dung dịch gốc DAPI (A.3.4).

5.2.9 Dung dịch làm việc DAPI (A.3.5).

5.2.10 Nước muối đệm phosphat (PBS), pH 7,3 (A.1.1).

5.2.11 Dầu soi kính không phát quang.

5.2.12 Dịch huyền phù gốc của kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* (Phụ lục B)

5.2.13 Dung dịch huyền phù của kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* đã đánh dấu và không thể sống được

Chất phát huỳnh quang đánh dấu có màu khác với màu của chất phát huỳnh quang được sử dụng để phát hiện các vi sinh vật đích

5.2.14 Môi trường bảo quản ký sinh trùng (A.3.6, A.3.7).

5.2.15 Nước đã loại khoáng và đã lọc (Nước siêu sạch loại 1).

5.2.16 Sơn móng tay (để gắn lamên vào lam kính, nếu cần).

## 6 Thiết bị, dụng cụ

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

6.1 Kẹp, để gắp mẫu rau quả khi cần.

6.2 Máy trộn nhu động có túi lọc tương thích kèm theo.

6.3 Máy ly tâm tốc, chứa được ít nhất 4 ống ly tâm hình nón, dung tích 50 ml cho mỗi lần ly tâm.

6.4 Ống Leighton thủy tinh.

6.5 Máy trộn quay, phù hợp với ống Leighton

6.6 Giá đỡ từ tính, phù hợp với ống Leighton.

6.7 Giá đỡ từ tính, sử dụng cho ống siêu ly tâm.

6.8 Lam kính, có các giếng, phủ 1 lớp kỵ nước, giếng có khả năng chứa được 50  $\mu$ l thể tích mẫu đã xử lý sau tách từ miễn dịch, và có tấm phủ đậy lên trên với kích thước thích hợp.

6.9 Khay làm ẩm lam kính, duy trì nhiệt độ từ 37 °C đến 42 °C, hoặc thiết bị làm khô lam kính tương đương.

6.10 Hộp giữ ẩm, có nắp đậy, chứa chất giữ ẩm, ví dụ: khăn giấy để có thể duy trì được nhiệt độ và độ ẩm thích hợp cho các thuốc thử miễn dịch huỳnh quang.

6.11 Thiết bị hút, nguồn chân không được gắn với bể chất lỏng và pipet, hoặc thiết bị tương đương.

**6.12 Kính hiển vi huỳnh quang với vật kính 20 X, 40 X và vật kính ngâm (nước, dầu) phóng đại 100 X và lưới thị kính hiệu chuẩn**, bao gồm bộ lọc fluorescein isothiocyanate (FITC) (bộ lọc sóng kích thích 480 nm, sóng phát xạ 520 nm) và bộ lọc DAPI (sóng kích thích 375 nm, sóng phát xạ lớn hơn 420 nm). Nếu sử dụng kiểm tra nội chuẩn thì phải có bộ lọc bổ sung phù hợp với chất phát huỳnh quang. Bộ phận quang tương phản giao thoa vi sai (DIC) có ưu thế. Hệ thống ghi hình gắn liền với kính hiển vi có thể thích hợp để ghi lại những trường hợp dương tính hay giả định.

**6.13 Kính kiểm soát FITC**, để đánh giá cường độ huỳnh quang và đánh giá xác nhận hiệu quả thỏa đáng của hệ thống quang học, của kính hiển vi huỳnh quang.

## **7 Lấy mẫu và vận chuyển**

### **7.1 Lấy mẫu**

Quy trình lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn cụ thể đối với sản phẩm có liên quan. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể thì khuyến cáo các bên liên quan (ví dụ: các cơ quan có thẩm quyền, nhà quản lý, khách hàng) tự thỏa thuận về vấn đề này.

### **7.2 Vận chuyển**

Các mẫu trái cây mềm và các mẫu quả mềm khác phải được bọc xếp cẩn thận trong quá trình vận chuyển để bảo vệ tính nguyên vẹn vật lý của chúng [xem 8.2 trong TCVN 6404 (ISO 7218)].

### **7.3 Tiếp nhận mẫu**

Các mẫu cần được đánh giá theo các tiêu chí chấp nhận áp dụng hướng dẫn phù hợp theo yêu cầu trong mục đích thử nghiệm [xem 8.3 trong TCVN 6404 (ISO 7218)]. Rau tươi ăn lá và quả mọng được coi là rất dễ hỏng và thực hiện phân tích càng sớm càng tốt ngay sau khi nhận được. Các tiêu chí để loại bỏ mẫu có thể bao gồm mẫu bị nấm mốc, mẫu bị thối, hoặc mẫu không còn nguyên vẹn trong trường hợp mẫu là quả mọng.

### **7.4 Bảo quản**

Rau tươi ăn lá và quả mọng phải được bảo quản trong tủ lạnh (từ 4°C đến 8°C) để giảm sự hư hỏng của mẫu [xem 8.4 trong TCVN 6404 (ISO 7218)].

### **7.5 Chuẩn bị mẫu thử**

Điều kiện sản phẩm tươi phải được ghi nhận trước khi tiến hành phân tích.

Khối lượng của mẫu thử ít nhất là 25 g.

Khuyến cáo, không dùng quá 100 g mẫu cho mỗi lần phân tích.



## TCVN 12363:2018

Khi phân tích toàn bộ một cây rau tươi ăn lá, chẳng hạn như cả một cây rau diếp, nên lựa chọn ngẫu nhiên các lá sạch lành lặn (không lấy phần cuống) từ các vị trí khác nhau của cây rau để kiểm tra.

Đối với các mẫu quả nhỏ, ví dụ như quả mâm xôi, thì lấy ngẫu nhiên các quả làm mẫu.

## 8 Cách tiến hành

### 8.1 Rửa để tách các ký sinh trùng ra khỏi rau tươi ăn lá

a) Cho mẫu vào túi lọc. Tránh mạnh tay quá mức. Nếu cần thì sử dụng kẹp để gấp mẫu.

Khuyến cáo mỗi mẫu đều được thêm chuẩn bằng huyền phù kiểm soát chiết tách nội chuẩn có chứa một lượng xác định kén hợp từ *Cryptosporidium* và/hoặc bào nang *Giardia* đã được đánh dấu từ trước và đếm số lượng, theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dùng pipet nhỏ huyền phù lên bề mặt lá rau; thực hiện thao tác này sau khi đã đặt mẫu vào hộp chứa để xử lý. Chất huỳnh quang đánh dấu sử dụng trong huyền phù kiểm soát chiết tách nội chuẩn phải khác với chất huỳnh quang sử dụng để phát hiện các kén hợp từ (bào nang) đích có trong mẫu thử. Nếu như không sử dụng huyền phù kiểm soát chiết tách nội chuẩn thì nên sử dụng mẫu kiểm chứng dương (xem 9.2).

b) Thêm 200 ml dung dịch đệm glyxin pH 5,5.

c) Xử lý mẫu trong máy trộn nhu động, trộn 30 s ở tốc độ từ 200 r/min đến 300 r/min.

d) Gạn dịch rửa giải và chia đều vào ống ly tâm đáy hình nón dung tích 50 ml, phân chia dịch rửa giải thu được đều nhau vào trong các ống nghiệm, giữ lại phần bã rau trong túi lọc. Bóp túi lọc thật chặt để bảo đảm lấy được hết dịch rửa giải ra khỏi mẫu. Có thể thu dịch rửa giải vào một bình chứa rồi chia đều vào các ống của máy ly tâm.

Ngoài ra, có thể chọn cách chuyển dịch rửa giải vào lọ ly tâm đáy hình nón dung tích 250 ml, nếu có sẵn máy ly tâm/rotor phù hợp để thực hiện bước tiếp theo.

Tráng lại phần bã trong túi lọc để tăng hiệu quả thu hồi. Sau khi đã chuyển hết dịch rửa giải ra khỏi túi lọc và trong khi các ống nghiệm đang ly tâm [xem e)], cho 10 ml dung dịch đệm glyxin 1 mol/l, pH 5,5 vào mẫu và bóp bên ngoài túi lọc. Sau khi chất bỏ phần chất lỏng nổi phía trên các ống ly tâm, cho nước tráng vừa thu được vào các ống ly tâm. Cho thêm tiếp 10 ml dung dịch đệm glyxin 1 mol/l, pH 5,5 vào túi, lặp lại thao tác bóp túi lọc chứa mẫu và nước, thêm nước tráng vào ống ly tâm. Cho ly tâm như mô tả ở e).

e) Tiến hành ly tâm tối đa ở 2500 g trong 10 min liên tục.

CHÚ THÍCH 1: Việc ly tâm tối đa ở 2500g có thể tạo ra các viên vón cục nhỏ. Việc sử dụng tốc độ tối đa thấp hơn 1100 g trong 10 min liên tục cho thấy thu hồi được lượng kén hợp từ *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* tương đương.

f) Dùng pipet hoặc bơm chân không loại bỏ lớp chất lỏng nổi phía trên, bảo đảm lớp hạt không bị xáo trộn. Nếu không nhìn thấy rõ các hạt thì cẩn thận để bảo đảm các ký sinh trùng không bị mất đi trong khi hút bỏ. Có thể thực hiện bằng cách để lại một lượng nhỏ chất lỏng ở đáy ống ly tâm.

g) Huyền phù lại hạt trong phần cặn chất lỏng còn lại ở đáy của từng ống ly tâm và thu dồn các hạt kết tủa vào một ống ly tâm riêng rẽ.

h) Tráng rửa từng ống ly tâm bằng hình nón dung tích 50 ml bằng nước cất vô trùng và đổ dồn nước tráng vào ống nghiệm chứa các hạt kết tủa. Lặp lại thao tác này cho đến khi lượng hạt được huyền phù trong ống nghiệm ly tâm không vượt quá dung tích của ống.

i) Tiến hành ly tâm dịch rửa giải tối đa ở 2500 g trong 10 min liên tục.

CHÚ THÍCH 2: Việc ly tâm tối đa ở 2500g có thể tạo ra các viên vón cục nhỏ. Việc sử dụng tốc độ tối đa thấp hơn 1100 g trong 10 min liên tục cho thấy thu hồi được lượng kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* tương đương.

jj) Dùng pipet hoặc bơm chân không loại bỏ lớp chất lỏng nổi phía trên, bảo đảm lớp hạt không bị xáo trộn. Nếu không nhìn thấy rõ các hạt thì cẩn thận để bảo đảm các ký sinh trùng không bị mất đi trong khi hút bỏ. Có thể thực hiện bằng cách để lại một lượng nhỏ chất lỏng ở đáy ống ly tâm.

k) Ước tính thể tích của các hạt cuối cùng thu được.

l) Huyền phù lại hạt trong 1 ml nước và chuyển huyền phù này vào ống Leighton. Tráng ống ly tâm bằng 2 ml nước và thu nước tráng vào ống Leighton. Lặp lại thao tác cho đến khi ống Leighton chứa 9 ml mẫu.

Nếu dung tích huyền phù hạt vượt quá dung tích do nhà sản xuất bộ thử IMS khuyến cáo thì chia mẫu ra thành các phần. Thêm nước đã loại ion cho đủ 9 ml.

CHÚ THÍCH 3: Từ thời điểm này, ống Leighton có thể được đậy nắp, bảo quản lạnh, và quy trình được tạm dừng đến 24 h.

## 8.2 Tách các ký sinh ra khỏi quả mọng

a) Cho mẫu vào bình chứa dung tích 500 ml, có nắp đậy. Tránh thao tác quá mạnh. Nếu cần thì sử dụng kẹp để gấp mẫu.

Khuyến cáo rằng mỗi mẫu được thêm chuẩn bằng huyền phù kiểm soát chiết tách nội chuẩn có chứa một lượng xác định các kén hợp tử *Cryptosporidium* và/hoặc các bào nang *Giardia* đã được đánh dấu từ trước và đếm số lượng, theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dùng pipet nhỏ huyền phù đều lên bề mặt quả mọng; thực hiện thao tác này sau khi đã đặt mẫu vào hộp chứa để xử lý. Chất huỳnh quang đánh dấu sử dụng trong huyền phù kiểm soát chiết tách nội chuẩn phải khác với chất huỳnh quang sử dụng để phát hiện các kén hợp tử (bào nang) đích có trong mẫu thử. Nếu như không sử dụng huyền phù kiểm soát chiết tách nội chuẩn thì nên sử dụng mẫu kiểm chứng dương (xem 9.2).

b) Thêm 200 ml glyxin 1 mol/l có pH 3,5.

## TCVN 12363:2018

c) Khuấy trộn nhẹ mẫu trong 1 min (ví dụ: bằng cách xoay hoặc lắc với tốc độ chậm) để giảm thiểu hư hỏng mẫu.

d) Chuyển dịch rửa giải này vào ống ly tâm hình nón. Nếu trong nước rửa có nhiều mảnh vụn quá thì lọc qua sàng hoặc qua túi lọc và thu gom nước rửa vào các ống ly tâm hình nón, thời gian để nước rửa chảy hết qua bộ lọc là 5 min.

CHÚ THÍCH 1: Dịch rửa giải có thể được chuyển vào chai ly tâm dung tích 250 ml có đáy hình nón, nếu có máy ly tâm/rotor phù hợp cho bước tiến hành tiếp theo.

e) Tráng rửa bình chứa (và sàng hoặc bộ lọc và túi lọc, nếu sử dụng như nêu trong d) bằng 50 ml dung dịch đệm glyxin 1 mol/l có pH 3,5.

f) Thu lấy nước tráng cho vào các ống ly tâm hình nón.

g) Ly tâm dịch rửa giải tối đa ở 2500 g trong 10 min liên tục.

CHÚ THÍCH 2: Việc ly tâm tối đa ở 2500 g có thể tạo ra các viên vón cục nhỏ. Việc sử dụng tốc độ tối đa thấp hơn 1100 g trong 10 min liên tục cho thấy độ thu hồi được lượng kén hợp từ *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* tương đương.

h) Dùng pipet hoặc bơm chân không loại bỏ lớp chất lỏng nổi phía trên, bảo đảm lớp hạt không bị xáo trộn. Nếu không nhìn thấy rõ các hạt thì cẩn thận để bảo đảm cho các ký sinh trùng không bị mất đi trong khi hút bỏ. Có thể thực hiện bằng cách để lại một lượng nhỏ chất lỏng ở đáy ống ly tâm.

i) Huyền phù lại hạt trong phần cặn chất lỏng còn lại ở đáy của từng ống ly tâm và thu dồn các kết tủa vào một ống ly tâm riêng rẽ.

j) Tráng rửa từng ống ly tâm rỗng hình nón dung tích 50 ml bằng nước cất vô trùng và đổ dồn nước tráng vào ống nghiệm chứa các hạt kết tủa. Lặp lại thao tác này cho đến khi lượng hạt được huyền phù trong ống ly tâm không vượt quá dung tích của ống.

k) Tiến hành ly tâm tối đa ở 2500 g trong 10 min liên tục.

CHÚ THÍCH 3: Việc ly tâm tối đa ở 2500 g có thể tạo ra các viên vón cục nhỏ. Việc sử dụng tốc độ tối đa thấp hơn 1100 g trong 10 min liên tục cho thấy độ thu hồi được lượng kén hợp từ *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* tương đương.

l) Dùng pipet hoặc bơm chân không loại bỏ lớp chất lỏng nổi phía trên, bảo đảm lớp hạt không bị xáo trộn. Nếu không nhìn thấy rõ các hạt thì cẩn thận để bảo đảm các ký sinh trùng không bị mất đi trong khi hút bỏ. Có thể thực hiện bằng cách để lại một lượng nhỏ chất lỏng ở đáy ống ly tâm.

m) Ước tính thể tích của các hạt cuối cùng thu được. Huyền phù lại các hạt trong 1 ml nước và chuyển vào ống Leighton. Tráng ống ly tâm bằng 2 ml nước và chuyển vào ống Leighton. Lặp lại thao tác cho đến khi trong ống Leighton chứa 9 ml mẫu.

Nếu dung tích huyền phù hạt vượt quá dung tích do nhà sản xuất bộ thử IMS khuyến cáo thì chia mẫu ra thành các phần mẫu. Thêm nước để loại ion cho đủ 9 ml.

CHÚ THÍCH 4: Từ thời điểm này, ống Leighton có thể được đậy nắp, bảo quản lạnh, và quy trình được tạm dừng đến 24 h.

### 8.3 Tách từ miễn dịch (IMS)

Kỹ thuật này bao gồm việc trộn dịch rửa giải mẫu đã cố đặc với các hạt thuận từ gắn các thể đặc hiệu với vách kén hợp tử *Cryptosporidium* hoặc bào nang *Giardia* trong môi trường đệm để đạt được sự kết gán tối đa. Sau đó, các bộ phức hợp hạt - kén hợp tử (bào nang) được tách ra khỏi các mảnh vụn khác có trong mẫu bằng nam châm. Sau khi tách, lại cho các kén hợp tử (bào nang) phân ly ra khỏi các hạt bằng cách khuấy mạnh trong điều kiện axit. Huyền phù các kén hợp tử (bào nang) nhỏ lên lam kính và trung hòa axit bằng NaOH (5.2.4).

Ở giai đoạn phân ly có thể thực hiện thêm bước tách thứ hai bằng cách cho thêm tiếp một lượng dung dịch axit clohydric vào bộ phức hợp hạt – kén hợp tử (bào nang) và lặp lại quá trình phân ly. Tiếp theo có hai cách thực hiện, cách 1 là phết huyền phù thu được từ mẻ phân ly lần thứ hai lên một lam kính thứ 2 có chứa NaOH, hoặc cách hai là phết thêm huyền phù của mẻ thứ hai này lên lam kính ban đầu và thêm một lượng NaOH tương ứng (để trung hòa).

CHÚ THÍCH 1: Các hướng dẫn chi tiết về cách tiến hành tách từ miễn dịch (IMS) không được nêu trong tiêu chuẩn này vì những hướng dẫn này phụ thuộc vào bộ kit thử được sử dụng.

CHÚ THÍCH 2: Các bộ kit có bán sẵn hiện có trên thị trường được thiết kế chuyên biệt cho các mẫu nước cố đặc [nước được xử lý hoặc nước chưa được xử lý để dùng làm nước uống hoặc các mẫu nước lấy từ môi trường].

CHÚ THÍCH 3: Có thể giảm số lượng hạt thuận từ và thể tích dung dịch đệm được khuyến cáo theo nhà sản xuất bộ kit IMS, nhưng không làm giảm việc tách rửa và hiệu quả cố đặc.

### 8.4 Nhuộm mẫu

- a) Sử dụng lam kính kiểm soát FITC để đảm bảo rằng cường độ của ánh sáng kích thích từ đèn phát ra đạt yêu cầu và ánh sáng được phân bố đồng đều.
- b) Chuẩn bị hai lam kính riêng rẽ với các kiểm chứng dương và kiểm chứng âm. Kiểm chứng dương có chứa huyền phù kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* (xem Phụ lục B). Kiểm chứng âm chứa nước khử khoáng đã lọc hoặc PBS. Các kiểm chứng dương và kiểm chứng âm phải bao gồm trong mỗi mẻ mẫu được nhuộm, phải được nhuộm và kiểm tra trước khi mẫu được xử lý tiếp [xem các bước từ e) đến j)]. Chỉ tiến hành tiếp các bước nhuộm các mẫu nếu các lam kính kiểm soát đã được nhuộm mẫu phù hợp.
- c) Dán nhãn các giếng trên lam kính phù hợp với số lượng mẫu và thể tích mẫu được phân tích (toàn bộ mẫu cần được phân tích).
- d) Cho một lượng thích hợp dung dịch NaOH 1 mol/l vào các giếng của lam kính theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ kit thử IMS được sử dụng, sau đó phân phối các lượng huyền phù chứa các kén hợp tử (nang) đã tách vào các giếng.

## TCVN 12363:2018

e) Đặt các lam kính có chứa mẫu vào khay làm ẩm lam kính, nhiệt độ ủ ẩm từ 37 °C đến 42 °C hoặc sử dụng thiết bị làm khô lam kính thích hợp khác để mẫu bay hơi đến khô. Có thể để khô các lam kính qua đêm ở nhiệt độ môi trường với điều kiện không tạo nguy cơ lây nhiễm chéo hoặc xáo trộn.

f) Cho vài giọt metanol (5.2.1) vào mỗi giếng chứa mẫu đã khô và để cho mẫu khô trong không khí ở nhiệt độ môi trường.

g) Phủ lên giếng mẫu các kháng thể đơn dòng đã đánh dấu huỳnh quang (mAbs) đặc hiệu cho kén hợp từ *Cryptosporidium* và/hoặc bào nang *Giardia* (5.2.5).

h) Đặt các lam kính vào hộp giữ ẩm (6.10), nếu cần và ủ các kháng thể cộng hợp theo quy định của nhà sản xuất.

CHÚ THÍCH 1: Các thể tích chính xác và thời gian ủ mẫu phụ thuộc vào hướng dẫn của nhà sản xuất và các giếng trên lam kính sử dụng.

i) Lấy các lam kính ra khỏi buồng ẩm và nhẹ nhàng loại bỏ các mAbs đã đánh dấu dư thừa ra khỏi mỗi giếng.

j) Nhỏ vào mỗi giếng 1 giọt dung dịch làm việc DAPI (5.2.9). Để yên ở nhiệt độ môi trường trong 2 min.

k) Nhẹ nhàng loại bỏ dung dịch làm việc DAPI dư thừa khỏi mỗi giếng bằng cách nghiêng lam kính. Cho vào mỗi giếng một giọt nước lọc đã khử khoáng; sau vài giây, nhẹ nhàng loại bỏ lượng nước thừa ra khỏi mỗi giếng.

CHÚ THÍCH 2: Đôi khi còn áp dụng thêm 1 bước rửa mẫu bằng PBS 0,01 mol/l, pH 7,2 trước khi rửa bằng nước đã khử khoáng.

l) Cho 1 giọt môi trường liên kết miễn dịch huỳnh quang vào các giếng chứa mẫu của lam kính.

m) Đậy lamén, chú ý không tạo ra các bọt khí trong môi trường liên kết. Nếu cần, giữ lại lamén bằng cách dùng sơn móng tay gắn kín mép xung quanh lamén để mẫu không bị khô và bảo quản ở nơi tối để tránh mẫu bị mất màu.

n) Bảo quản lam kính ở nơi tối cho đến khi kiểm tra. Cần kiểm tra các lam kính này càng sớm càng tốt sau khi được chuẩn bị xong, tốt nhất là trong vòng 24 h.

## 8.5 Soi bằng kính hiển vi

### 8.5.1 Nhận xét chung

Để phân tích tất cả các mẫu đã được chuẩn bị nên sử dụng một kính hiển vi huỳnh quang, tốt nhất là có gắn với DIC.

Cần ít nhất hai bộ lọc khối; nếu sử dụng các kiểm chứng tách chiết nội chuẩn thì cần 3 bộ lọc khối. Trong ví dụ được đưa ra trong 8.5.2.1, các bộ lọc đó là:

- a) Bộ lọc FITC (bước sóng kích thích 480 nm, bước sóng phát xạ 520 nm),
- b) Bộ lọc DAPI (bước sóng kích thích 375 nm, bước sóng phát xạ 420 nm), và
- c) Bộ lọc Texas Red (bước sóng kích thích 555 nm, bước sóng phát xạ 630 nm).

Sử dụng vật kính và thị kính với tổng độ phóng đại là 200X hoặc 400X và 1000X. Tham khảo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất về chi tiết cấu hình của kính hiển vi.

Định kỳ hiệu chuẩn thước đo thị kính (đường chữ thập).

## 8.5.2 Kiểm tra mẫu đã chuẩn bị sử dụng kính hiển vi huỳnh quang

### 8.5.2.1 Yêu cầu chung

Ánh sáng phát ra từ đèn hơi thủy ngân có thể thay đổi và giảm dần khi bóng đèn được sử dụng lâu. Cần thường xuyên kiểm tra cường độ ánh sáng bằng cách sử dụng lam kính kiểm soát huỳnh quang.

Sử dụng kính hiển vi huỳnh quang để kiểm tra các lam kính kiểm chứng đã đánh dấu ở độ phóng đại 200X hoặc 400X để đảm bảo rằng trên lam kính kiểm chứng dương, kén hợp tử (nang) đã được đánh dấu đúng bởi mAbs, và trên lam kính kiểm chứng âm không có chứa kén hợp tử (bào nang). Sử dụng bộ lọc ánh sáng kích thích UV kiểm tra hàm lượng của các kén hợp tử (bào nang) để đảm bảo rằng các chất liệu hạt nhân đã được đánh dấu chính xác bởi DAPI.

Nếu trong các lam kính kiểm chứng dương không thấy các kén hợp tử (bào nang) phát huỳnh quang thì thực hiện nhuộm lại trước khi xử lý mẫu. Nếu trong các lam kính kiểm chứng âm thấy có các kén hợp tử (bào nang) phát huỳnh quang thì cần tiến hành điều tra để xác định nguồn lây nhiễm. Cần chuẩn bị thuốc thử mới và nhuộm lại các lam kính kiểm chứng trước khi tiếp tục tiến hành xử lý mẫu.

Khi các bước kiểm soát cho thấy thỏa đáng, tiến hành kiểm tra các lam kính mẫu và các mẻ hoặc các phép kiểm soát xử lý mẫu theo quy định dưới đây, quét toàn bộ và có hệ thống từng giếng bằng kính hiển vi huỳnh quang ở độ phóng đại 200X hoặc 400X. Sử dụng chế độ quét từ phía này sang phía kia hoặc từ trên xuống dưới.

Nếu sử dụng mẻ mẫu kiểm chứng dương thì có thể tiến hành kiểm tra các lam kính sử dụng bộ lọc FITC (xanh). Sử dụng độ phóng đại 200X hoặc 400X để soi sơ bộ và ghi lại số lượng các vật thể giả định/được coi là kén hợp tử *Cryptosporidium* hoặc bào nang *Giardia*. Cần kiểm tra kỹ hơn để khẳng định; các vật thể giả định ở mức phóng đại 1000X sử dụng nước hoặc vật kính nhúng dầu để soi kính. Kiểm tra toàn bộ lam kính ở độ phóng đại thấp sau đó xác định các vật thể giả định ở độ phóng đại cao hơn sẽ dễ hơn là soi khô ở độ phóng đại thấp, sau đó chuyển ngay sang độ phóng đại cao mỗi khi thấy kén hợp tử (bào nang) giả định.

## TCVN 12363:2018

Nếu sử dụng kiểm chứng dương thì các lam kính thử nghiệm phải được kiểm tra để nhận biết: có phải mỗi đối tượng được nhuộm là một sinh vật kiểm chứng gốc hay là bị nhiễm tự nhiên và để khẳng định từng kén hợp tử (bào nang) tự nhiên giả định/có thể đúng. Ví dụ, khi sử dụng các bộ lọc FITC đã gắn mAbs và Texas Red đã gắn kiểm soát kén hợp tử (bào nang) dương, thì sử dụng bộ lọc FITC để quét lam kính đối với các đối tượng phát huỳnh quang. Đối với mỗi đối tượng mà đáp ứng các đặc điểm nêu trong Bảng 1 thì sử dụng bộ lọc khối Texas Red để nhận biết đối tượng có phải là sinh vật cần kiểm tra hay không. Nếu đúng là sinh vật cần kiểm tra thì sử dụng bộ lọc khối DAPI để xác nhận đối tượng nhuộm DAPI, ghi lại số lượng, rồi quay trở lại dùng bộ lọc FITC và tiếp tục tiến hành với các đối tượng tiếp theo.

Những đối tượng có đặc tính của *Cryptosporidium* hoặc *Giardia*, mà không phải là các vi sinh vật kiểm chứng gốc, thì phải được đo bằng thước đo thị kính, ghi lại kết quả đo và phải được kiểm tra tiếp sử dụng bộ các lọc DAPI (xem 8.5.2.3) và DIC (xem 8.5.3) để khẳng định ở độ phóng đại 1000X, sử dụng vật kính ngâm dầu hoặc nước. Ghi lại số lượng kén hợp tử (bào nang).

### 8.5.2.2 Nhận biết kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia*: FITC

Các đặc tính thông thường của kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* khi đánh dấu bằng FITC-mAbs và được kiểm tra bằng kính hiển vi huỳnh quang được liệt kê trong Bảng 1.

**Bảng 1 – Các đặc tính sử dụng để nhận biết các kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* được đánh dấu bằng FITC-mAbs**

Kén hợp tử <i>Cryptosporidium</i>	Bào nang <i>Giardia</i>
Huỳnh quang xanh lá cây bao quanh toàn bộ kén - thường thấy rõ hai đường viền	Huỳnh quang xanh lá cây bao quanh toàn bộ bào nang
Hình cầu hoặc hình hơi bầu dục	Thường có hình elip/hình bầu dục nhưng bào nang đã được làm khô trên lam kính ở vị trí thẳng đứng, chúng có thể xuất hiện ở dạng hình cầu hoặc dạng hình cầu khuyết.
Một số kén sẽ có nếp gấp hoặc hình cầu khuyết; một số kén có thể có ngoại hình "pac-man" điển hình (như nhân vật trò chơi điện tử)	Một số bào nang có các nếp gấp và nhân
Đường kính từ 4 $\mu\text{m}$ đến 6 $\mu\text{m}$	Kích thước (theo đường trục ngang của bào nang) (từ 8 $\mu\text{m}$ đến 12 $\mu\text{m}$ ) x ( từ 7 $\mu\text{m}$ đến 10 $\mu\text{m}$ )

Cẩn thận khi đếm các đối tượng bị méo và hư hỏng nặng, đặc biệt là khi không quan sát thấy được kén hợp tử hoặc bào nang "điển hình".

Mặc dù đa số các kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* có thể giống như mô tả trong Bảng 1 nhưng vẫn có sự sai lệch so với những mô tả này, đặc biệt đối với những ký sinh trùng đã từng ở trong môi trường một thời gian. Sai lệch phổ biến nhất là sự phát huỳnh quang yếu hoặc "mờ". Phải đưa ra mô tả cho mỗi ký sinh trùng được nhận dạng. Nếu không thể xác nhận rằng các đối tượng là ký sinh trùng (bằng cách nhuộm nhân DIC và/hoặc nhuộm DAPI, hoặc bằng các kỹ thuật phân tử tiếp theo) thì chúng nên được ghi là "có thể đúng" hoặc "giả định".

CHÚ THÍCH 1: Một số loài cả *Cryptosporidium* và *Giardia* đã được công nhận. Dải kích thước được mô tả trong Bảng 1 chủ yếu là của *G. duodenalis* và các loài chính của *Cryptosporidium* gây bệnh cho người. Một số loài *Cryptosporidium* có đường kính đến 8 µm (ví dụ: *C. andersoni* và *C. muris*) nhưng hiếm khi gây bệnh cho người.

Các đối tượng khác có thể được tách rữa ra từ thực phẩm tươi, có thể có kích thước, cấu trúc và đặc tính nhuộm tương tự như của các kén hợp tử *Cryptosporidium* hoặc bào nang *Giardia*. Do đó, điều quan trọng là tất cả các đối tượng có các đặc điểm này phải được khẳng định hoặc bác bỏ bằng các nghiên cứu bổ sung. Nếu không thể khẳng định hoặc bác bỏ do thiếu các điểm đặc trưng như nhân thì các đối tượng này nên được cho là có thể đúng/giả định. Trong những trường hợp này, nên để các chuyên gia từ các phòng thử nghiệm khác kiểm tra các lam kính này để khẳng định hoặc bác bỏ các đối tượng phát hiện được.

CHÚ THÍCH 2: Các kén hợp tử và bào nang kiểm soát tách chiết nội chuẩn cũng phát huỳnh quang phù hợp với chất phát huỳnh quang mà chúng được gắn vào.

### 8.5.2.3 Nhận biết kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia*: DAPI

Mỗi kén hợp tử (bào nang) giả định cần phải được kiểm tra về sự có mặt của các nhân nhuộm DAPI. Chuyển sang đúng bộ lọc UV trên kính hiển vi để quan sát DAPI. Đầu tiên, sử dụng vật kính 40X và vật kính ngâm dầu hoặc ngâm nước 100X, nếu cần. Nhân của các kén hợp tử (bào nang) đã nhuộm DAPI sẽ có huỳnh quang màu xanh da trời.

Các đặc điểm phổ biến của kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* khi nhuộm bằng DAPI và soi bằng kính hiển vi huỳnh quang được liệt kê trong Bảng 2.

Các đặc điểm nhuộm bằng DAPI đối với mỗi kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* giả định phải được ghi lại.



Bảng 2 – Các đặc điểm của kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* nhuộm bằng DAPI

Kén hợp tử <i>Cryptosporidium</i>	Bào nang <i>Giardia</i>
Trong các kén, nhân thoa trùng xuất hiện dưới dạng các chấm nhỏ, riêng biệt.	Trong các bào nang, nhân thể tự dưỡng xuất hiện dưới dạng những chấm riêng biệt, thường nằm ở một cực của bào nang.
Nếu kén chứa thoa trùng (không chỉ là vỏ) thì thường thấy cả bốn thoa trùng trong nhân, mặc dù chúng thường không nằm trong cùng một mặt phẳng hội tụ. Chính tiêu cự lên và xuống.	Nếu bào nang có cơ chất và nhân rõ ràng thì thường có hai hoặc bốn, tùy thuộc vào giai đoạn sinh sản của bào nang. Chúng có thể nằm trong trường tiêu cự khác nhau, do đó, điều quan trọng là phải chỉnh tiêu cự lên và xuống.
Đôi khi, nhưng hiếm khi, việc nhuộm DAPI bị khuếch tán.	Thường thì việc nhuộm DAPI bị khuếch tán, bởi chất liệu nhân không còn phân biệt rõ với các cơ chất khác. Tuy nhiên, có thể quan sát thấy các vạch huỳnh quang cường độ cao nằm ở một cực của nang.

Nếu kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* (chỉ có vỏ kén/nang) mà không có nhân thì không phải nhuộm DAPI nội chuẩn. Các mẫu này sẽ được báo cáo là giả định.

Những ký sinh trùng bị vỡ trong quá trình sấy trên lam kính (việc này đôi khi có thể xảy ra, đặc biệt với những ký sinh trùng đã già hóa hoặc đã bị ức chế với môi trường xung quanh) có thể có các thành phần bên trong gần sát chúng và nhân tự dưỡng của *Giardia* hoặc nhân thoa trùng của *Cryptosporidium* có thể phân bố rõ sát vỏ thành của kén hoặc nang. Trường hợp này phải được nghiên cứu cụ thể đối với những ký sinh trùng không thấy rõ thành phần bên trong và phải được ghi chép lại phù hợp.

Một số ký sinh trùng giống như kén hợp tử *Cryptosporidium* hoặc bào nang *Giardia* nhưng thực ra những ký sinh trùng này lại không thể có được những đặc tính nhuộm DAPI điển hình như kén hợp tử (bào nang), bao gồm phát huỳnh quang đỏ các lục lạp, tinh thể, bào tử v.v. . Sự có mặt các đặc tính này cho thấy đối tượng không phải là kén hợp tử (bào nang). Tuy nhiên, cần lưu ý rằng Evans Blue (là phần chất nhuộm màu có trong nhiều sản phẩm mAbs bán sẵn) có thể làm cho một số thành phần trong tế bào phát ra huỳnh quang đỏ. Ngoài ra, nền màu đỏ của Evans Blue không phù hợp để kiểm tra các lam kính có chứa các kén hợp tử (bào nang) kiểm soát được nhuộm bằng Texas Red. DNA của hệ vi sinh vật khác cũng bắt màu khi nhuộm DAPI nên cần chú ý để đảm bảo rằng không nhầm lẫn DNA này với DNA của ký sinh trùng đang nghiên cứu.

### 8.5.3 Kiểm tra mẫu đã chuẩn bị sử dụng kính hiển vi DIC

#### 8.5.3.1 Yêu cầu chung

Sau khi kiểm tra đối tượng bằng kính hiển vi huỳnh quang sử dụng FITC, Texas Red (hoặc các loại khác) và các bộ lọc DAPI, tiến hành khẳng định kết quả nhận dạng bằng kính hiển vi DIC. Chặn tia cực tím và bật nguồn phát sáng, đảm bảo rằng trên vật kính đã lắp đúng vào tháp kính, bộ lọc DIC và lăng kính hội tụ ánh sáng dưới bàn soi vào đúng vị trí.

Đẩy bộ lọc DIC và lăng kính vào vị trí và chỉnh tối ưu hóa hình ảnh rõ nét bằng cách điều chỉnh cường độ ánh sáng và/hoặc xoay vít điều chỉnh trên lăng kính.

#### 8.5.3.2 Nhận dạng kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* bằng kính hiển vi DIC

Đối với những người sử dụng chưa có kinh nghiệm, trước tiên, kiểm tra lam kính kiểm chứng dương, như là sự nhớ lại về các đặc điểm hình thái bên ngoài hay bên trong, đặc trưng của kén hợp tử *Cryptosporidium* hoặc bào nang *Giardia*, quan sát được bằng kính hiển vi DIC.

Sau đó kiểm tra các kén, nang giả định và kén, nang đã được khẳng định bằng DAPI soi dưới kính hiển vi quang huỳnh quang. Ban đầu sử dụng vật kính 40X và sau đó là vật kính 100X nhúng dầu hoặc nước.

Đo kích thước của mỗi ký sinh trùng hoặc ký sinh trùng giả định theo hai trục và tìm các đặc điểm hình thái bên ngoài hoặc bên trong điển hình của kén hợp tử *Cryptosporidium* hoặc bào nang *Giardia*.

Các đặc tính của kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* khi kiểm tra bằng kính hiển vi DIC được nêu trong Bảng 3.

**Bảng 3 – Các đặc điểm của kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* bằng kính hiển vi DIC**

Kén hợp tử <i>Cryptosporidium</i>		Bào nang <i>Giardia</i>	
Các kén nguyên vẹn có các thành phần bên trong	Các kén không có thành phần bên trong (thoát ra khỏi kén, vỡ kén)	Các nang nguyên vẹn có các thành phần bên trong	Các nang không có thành phần bên trong (thoát ra khỏi nang, vỡ nang)
Hình cầu hoặc hơi ovan, mịn, không máu và có khúc xạ, vùng trung tâm lồi, bề mặt xuất hiện không đều. Có thể quan sát thấy thành kén dày. Cũng có thể thấy các thoa trùng bên trong kén, cũng như thấy rõ điểm khúc xạ (phần còn lại).	a) Hình cầu hoặc hơi ovan với thành kén dày. Có thể thấy phần khúc xạ còn lại. Điều này cho thấy kén đã vỡ hoặc các thành phần đã thoát ra khỏi kén. b) Hình cầu hoặc hơi ovan ("pac-man" rõ ràng). Có thể quan sát thấy thành kén dày.	Thành nang dày, phẳng hình elip/ovan và vùng trung tâm lồi.  Nếu đã thấy nhân nhuộm bằng DAPI thì nhân sẽ nằm ở một cực của bào nang. Cũng thấy dấu vết còn lại của sợi trục tiêm mao nằm chéo qua trục dài của bào nang và trung thể nằm ngang ở phần giữa của bào nang.	a) Dạng ovan có thành kén dày, vùng trung tâm xuất hiện phẳng và không rõ nét.  b) Dạng ovan có thành kén dày, có thể có những nếp nhăn, vết nứt và biến dạng.

## TCVN 12363:2018

Đối với một số mẫu, việc kiểm tra kén hợp tử (bào nang) giả định bằng cách sử dụng DIC có thể không thực hiện được do có các mảnh vụn gây nhiễu quá mức. Trong những trường hợp này, cần ghi lại và quyết định nhận dạng phải dựa trên các đặc điểm của FITC-mAbs và DAPI đã được đánh dấu.

CHÚ THÍCH 1: Việc nhận biết các sinh vật sử dụng DIC cần có nhiều kinh nghiệm. Các đặc tính được đưa ra trong Bảng 3 chỉ là để hướng dẫn. Việc nhận biết sai các vật thể có hình dạng kén hợp tử (bào nang) có thể xảy ra ngay cả ở giai đoạn nhận biết này.

CHÚ THÍCH 2: Các vật thể giống như kén hợp tử *Cryptosporidium* hoặc bào nang *Giardia* nhưng thực ra lại không phải, có thể có các đặc điểm hình thái bên ngoài hoặc bên trong không điển hình của kén hợp tử (bào nang) và không nhìn thấy bằng kính hiển vi huỳnh quang. Những đặc điểm này bao gồm: gai, thân, phần phụ, lỗ hồng, một hoặc hai nhân lớn làm đầy tế bào, chất diệp lục, các tinh thể, bào tử, v.v. Sự có mặt các đặc điểm này chỉ ra rằng vật thể đó không phải là kén hợp tử (bào nang).

## 9 Quy trình kiểm soát chất lượng

### 9.1 Yêu cầu chung

Phòng thử nghiệm tiến hành phép thử phải có hệ thống kiểm soát chất lượng được xác định rõ ràng để đảm bảo rằng thiết bị, thuốc thử và kỹ thuật là thích hợp cho việc phân tích này.

### 9.2 Kết luận và diễn giải các kiểm chứng

Có thể sử dụng các kiểm chứng tách chiết nội chuẩn (xem 3.5) để xác minh rằng sau bước rửa giải phương pháp này hoạt động có hiệu quả. Nếu không phát hiện được kén hợp tử (bào nang) đánh dấu đã được đưa vào thì quy trình phân tích không đạt.

Nếu không sử dụng kiểm chứng tách chiết nội chuẩn thì có thể tạo ra mẫu kiểm chứng dương tính (xem 3.6) bằng cách thêm chuẩn mẫu bổ sung với khoảng 100 kén hợp tử *Cryptosporidium* và/hoặc bào nang *Giardia* (xem Phụ lục B). Dùng pipet nhỏ mẫu huyền phù thêm chuẩn lên bề mặt của lá rau hoặc quả mọng. Việc kiểm soát quá trình kiểm chứng dương nên thực hiện theo định kỳ (ví dụ: cứ 20 mẫu kiểm tra 1 mẫu kiểm chứng dương, nhưng tối thiểu kiểm tra 4 lần). Nếu không có (kén) nang nào được phát hiện thì quy trình phân tích không đạt.

Việc kiểm soát chứng âm (xem 3.7) cần tiến hành định kỳ tùy theo yêu cầu của mục đích thử nghiệm. Nếu phát hiện được các (kén) nang trong mẫu kiểm chứng âm tính thì chứng tỏ đã có sự lây nhiễm chéo xảy ra trong quá trình phân tích, và bất kỳ mẫu nào mà xét nghiệm cho kết quả dương tính thì đều phải được coi là dương tính giả.

### 9.3 Vệ sinh thiết bị, dụng cụ

Tất cả các thiết bị, dụng cụ tái sử dụng phải được rửa kỹ trong nước có chứa chất tẩy rửa và sau đó tráng sạch trong nước khử ion để loại bỏ bất kỳ (kén) nang nào có thể đã bám vào thiết bị.

Các dụng cụ sử dụng cho quá trình kiểm chứng dương cần được rửa riêng (nếu có thể, ở một khu vực riêng biệt) tránh xa khỏi các dụng cụ dùng để phân tích mẫu.

Việc sử dụng các vật liệu dùng một lần (ví dụ: túi đựng dùng cho máy trộn) để tránh lây nhiễm chéo, nhưng không khả thi đối với tất cả các thiết bị, dụng cụ (ví dụ: ống Leighton). Khả năng rửa là sử dụng các bộ thiết bị như nhau cho các quy trình kiểm chứng dương. Tuy nhiên, thực hiện đầy đủ các biện pháp rửa thích hợp và kiểm soát chất lượng (như chạy các mẫu kiểm chứng âm ngay sau khi chạy mẫu kiểm chứng dương, sử dụng cùng một thiết bị nhưng được rửa sạch) có thể là đủ.

Việc phân tích các mẫu kiểm chứng âm cần được ghi lại giống như khi phân tích mẫu kiểm chứng dương.

CHÚ THÍCH: Việc sử dụng dung dịch hypochlorit có chứa ít nhất 1 000 mg/l clo tự do có thể sẽ hữu ích trên các thiết bị đã được làm sạch trước để tránh phát hiện được các kén hợp tử (bào nang) do ô nhiễm chéo, vì nó phá vỡ phần phân tử kháng nguyên ở vị trí gắn với mAbs.

## 10 Báo cáo kết quả

### 10.1 Biểu thị kết quả

Kết quả cần nêu rõ số lượng kén hợp tử *Cryptosporidium* và/hoặc bào nang *Giardia* phát hiện được trên khối lượng mẫu sản phẩm tươi được kiểm tra.

Nếu sử dụng các kiểm chứng tách chiết nội chuẩn thì số lượng kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* đã đánh dấu trước và số lượng kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* phát hiện được phải được so sánh với số lượng đã được thêm chuẩn vào mẫu và tính phần trăm thu hồi đối với từng mẫu. Nếu sử dụng mẫu kiểm chứng dương thì số lượng kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* phát hiện được phải được so sánh với số lượng đã được thêm chuẩn vào mẫu và tính phần trăm thu hồi.

### 10.2 Báo cáo kết quả thử nghiệm

Báo cáo kết quả thử nghiệm phải bao gồm các thông tin sau:

- a) Viện dẫn tiêu chuẩn này;
- b) Tất cả các chi tiết cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử, bao gồm nền mẫu, nguồn mẫu và chuỗi sản xuất được biết đến và bất kỳ chi tiết về lô hoặc mã nhận dạng lô hàng;
- c) Ngày lấy mẫu;
- d) Khối lượng mẫu đã lấy;
- e) Ngày phòng thử nghiệm nhận được mẫu;

**TCVN 12363:2018**

f) Ngày bắt đầu phân tích;

g) Khối lượng mẫu phân tích;

h) Phương pháp đã sử dụng, đặc biệt bao gồm 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;

i) Số lượng kén hợp tử *Cryptosporidium* và bào nang *Giardia* phát hiện được và bất kỳ chi tiết có liên quan đến việc nhận dạng và xác nhận chúng (ví dụ: kích cỡ, phép nhuộm DAPI, chi tiết hình thái);

j) Sự không có mặt của sinh vật, nghĩa là không phát hiện được, sẽ được biểu thị là "không phát hiện được" trên khối lượng mẫu được phân tích;

k) Đã bao gồm hoặc không bao gồm các kiểm chứng mẫu. Báo cáo phản trầm thu hồi, xác định cho từng mẫu bằng kiểm soát tách chiết nội chuẩn hoặc cho từng lô bằng quá trình kiểm chứng dương và giới hạn phát hiện tính được;

i) Ngày kết thúc phân tích;

m) Họ tên và chữ ký của người phân tích; nếu có nhiều hơn một người phân tích thực hiện thì cần chỉ rõ người nào phân tích đã thực hiện phân tích công đoạn nào.

**Phụ lục A**

(Quy định)

**Chuẩn bị thuốc thử****A.1 Thuốc thử chung****A.1.1 Muối đệm phosphat (PBS)**

Natri clorua (NaCl)	8,0 g
Dinatri hydrophosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1,15 g
Kali dihydrophosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,2 g
Kali clorua (KCl)	0,2 g
Nước đã khử ion	1 000 ml

Hoà tan các thành phần trong 800 ml nước và chỉnh pH đến  $7,3 \pm 0,2$  bằng HCl 1 mol/l hoặc NaOH 1 mol/l, sau đó thêm nước đến 1 lít.

Bảo quản ở nhiệt độ phòng  $20\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$  trong thời gian tối đa là sáu tháng.

**A.2 Các thuốc thử để rửa tách các ký sinh từ sản phẩm tươi****A.2.1 Dung dịch đệm glyxin 1 mol/l, pH 5,5**

Glycin ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ )	75,07 g
--	---------

Hoà tan thành phần trong 800 ml nước và chỉnh pH đến  $5,5 \pm 0,2$  bằng HCl 1 mol/l hoặc NaOH 1 mol/l, sau đó thêm nước đến 1 lít.

Bảo quản dung dịch này ở  $5\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$  trong thời gian tối đa là 3 tháng.

**A.2.2 Dung dịch đệm glyxin 1 mol/l, pH 3,5**

Glyxin ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ )	75,07 g
--	---------

Hoà tan các thành phần trong 800 ml nước và điều chỉnh pH đến  $3,5 \pm 0,2$  bằng HCl 1 mol/l hoặc NaOH 1 mol/l, sau đó thêm nước đến 1 lít.

Bảo quản ở  $5\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$  trong thời gian tối đa là 3 tháng.

## TCVN 12363:2018

### A.3 Các thuốc thử sử dụng trong việc cô đặc, cố định, nhuộm, phát hiện và QC

A.3.1 Axit clohydric (HCl), 0,1 mol/l.

A.3.2 Natri hydroxit (NaOH), 1 mol/l.

A.3.3 Môi trường liên kết miễn dịch huỳnh quang

1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	2,0 g
Glycerol	60 ml
PBS (A.1.1)	40 ml

Để chuẩn bị, hòa tan DABCO trong PBS và thêm glycerol. Chính pH đến 7,1 ± 0,2 bằng HCl 0,1 mol/l hoặc NaOH 1 mol/l. Cho vào lọ và bảo quản ở nhiệt độ 5 °C ± 3 °C cho đến khi sử dụng.

A.3.4 Dung dịch DAPI gốc

DAPI	1 mg
Metanol	0,5 ml

Để chuẩn bị, cho 0,5 ml metanol vào lọ chứa 1 mg DAPI (5.2.7).

Bảo quản dung dịch này ở nơi tối trong 5 °C ± 3 °C, tối đa đến 12 tháng.

A.3.5 Dung dịch DAPI làm việc

Dung dịch DAPI gốc (A.3.4)	10 µl
PBS	50 ml

Chuẩn bị bằng cách pha loãng 10 µl dung dịch DAPI gốc vào PBS.

Bảo quản dung dịch này ở nơi tối trong 20 °C ± 5 °C, tối đa đến 1 tháng.

A.3.6 Dung dịch natri azid gốc

Natri azid (NaN <sub>3</sub> )	100 mg
Nước đã khử ion	5 ml

Để chuẩn bị, hòa tan natri azid trong nước.

Bảo quản dung dịch này ở 5 °C ± 3 °C trong một năm. Natri azid rất độc khi tiếp xúc với da, với mắt, nuốt phải hoặc hít phải. Việc phơi nhiễm quá mức có thể dẫn đến tử vong. Phải tuân thủ hướng dẫn an toàn.

**A.3.7 Môi trường bảo quản ký sinh trùng**

Dung dịch natri azid gốc (A.3.6)	1 ml
Nước đã khử ion	100 ml

Để chuẩn bị, cho 1 ml dung dịch natri azid gốc (A.3.6) vào 100 ml nước khử ion.

Bảo quản dung dịch này ở  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  tối đa đến 1 tháng.



**Phụ lục B**  
(Quy định)

**Chuẩn bị huyền phù kiểm soát quá trình dương tính**

**B.1 Yêu cầu chung**

Chuẩn bị các dung dịch huyền phù kiểm soát quá trình dương tính để sử dụng cho kháng thể đơn dòng và nhuộm DAPI để soi kính hiển vi. Các dung dịch này được chuẩn bị cho việc thêm chuẩn vào các mẫu nhằm xác định hiệu quả thu hồi của quy trình thử nghiệm. Phụ lục C cung cấp thông tin về phần trăm thu hồi đạt được bằng phương pháp này.

**B.2 Xác định mật độ kén hoặc nang trong dung dịch huyền phù gốc**

Các huyền phù gốc của kén hợp tử (bào nang) sử dụng cho phép kiểm chứng dương cần được đếm và sau đó sử dụng để chuẩn bị liều kiểm soát quá trình dương tính.

Có thể sử dụng công thức dưới đây để xây dựng liều nuôi cấy hoặc thể tích thêm chuẩn từ các kén hợp tử (bào nang) gốc:

C là nồng độ cần thiết cho mỗi ml liều bổ sung;

S là nồng độ gốc;

V là thể tích dung dịch gốc cần thiết để tạo 1 ml liều yêu cầu

$$V = C/S$$

Ví dụ: Nếu cần một liều nồng độ 10 000 kén hợp tử (bào nang) trong mỗi 0,1 ml thì nồng độ cần thiết là 100 000 kén hợp tử (bào nang) trên mỗi ml.

$$C = 100\ 000$$

Nếu nồng độ của dung dịch gốc là 214 000 kén hợp tử (bào nang) trên mỗi ml

$$S = 214\ 000$$

Thể tích dung dịch gốc cần thiết để pha được 1 ml nồng độ 100 000

$$V = 100\ 000/214\ 000 = 0,467\ \text{ml hoặc } 467\ \mu\text{l.}$$

Do đó, thêm nước vào 467  $\mu\text{l}$  dung dịch gốc để đủ có 1 ml. Như vậy sẽ cho phép chuẩn bị được 10 liều 0,1 ml, mỗi liều chứa 10 000 kén hợp tử (bào nang).

Bảo quản ở  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , không được bảo quản huyền phù đông lạnh và phải thường xuyên kiểm tra chất lượng. Huyền phù kén và nang không được để quá ba tháng. Các huyền phù gốc phải được kiểm tra bằng kính hiển vi để bảo đảm rằng không bị vón cục hoặc kết mảng. Có thể làm tan các mảng vón cục bằng cách lắc mạnh.

### **B.3 Dữ liệu hiệu năng đối với các huyền phù kiểm chứng dương**

Chuẩn bị 10 ml dịch huyền phù kén hợp tử *Cryptosporidium* và/hoặc bào nang *Giardia* bằng cách pha loãng một thể tích tương ứng dịch huyền phù gốc đậm đặc để thu được nồng độ cuối cùng khoảng  $1 \times 10^3$  sinh vật/ml, nghĩa là có khoảng 100 kén và nang mỗi sinh vật trong 100  $\mu\text{l}$ .

Xoay trộn huyền phù trong 30 s và sau đó phân phối các lượng 100  $\mu\text{l}$  vào các giếng của lam kính hiển vi.

Làm khô, cố định và nhuộm (xem 8.4). Tiến hành xác định số lượng kén và nang trên các lam kính bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang (xem 8.5.2).

Tính giá trị trung bình của mỗi sinh vật có trên từng lam kính, độ lệch chuẩn và hệ số biến thiên. Ghi lại kết quả. Đảm bảo rằng, hệ số biến thiên cho mỗi mẻ các liều thêm chuẩn được chuẩn bị thủ công, sẽ nhỏ hơn 20. Nếu thấy có sai lệch lớn hơn thì chuẩn bị một mẻ mới. Phải đảm bảo rằng số lượng trung bình các sinh vật trong mỗi liều trong khoảng từ 80 đến 120.

**Phụ lục C**  
(Tham khảo)

**Phần trăm thu hồi đạt được bằng các phương pháp**

**Kén hợp từ *Cryptosporidium***

Loại mẫu	Phần trăm thu hồi	Tài liệu tham khảo
Cải brussel	34 <sup>b</sup>	Rzezutka <i>et al.</i> (2010) <sup>[22]</sup>
Súp lơ	16 <sup>b</sup>	Rzezutka <i>et al.</i> (2010) <sup>[22]</sup>
Xà lách	25	Cook <i>et al.</i> (2007) <sup>[8]</sup>
Tỏi tây	14 - 21 <sup>b</sup>	Rzezutka <i>et al.</i> (2010) <sup>[22]</sup>
Rau diếp	19 <sup>b</sup>	Rzezutka <i>et al.</i> (2010) <sup>[22]</sup>
Rau diếp/cải bắp	24,5 ± 3,5 <sup>b</sup>	Amoros <i>et al.</i> (2010) <sup>[23]</sup>
Rau diếp (Gem)	3 <sup>b</sup>	Cook <i>et al.</i> (2007) <sup>[8]</sup>
Rau diếp (rau diếp xoắn)	49,2 <sup>b</sup>	Cook <i>et al.</i> (2007) <sup>[8]</sup>
Rau diếp (Romaine)	13 <sup>b</sup>	Cook <i>et al.</i> (2007) <sup>[8]</sup>
Xà lách (Webb's)	59,0 ± 12,0 <sup>a</sup>	Cook <i>et al.</i> (2006a) <sup>[9]</sup>
Xà lách hỗn hợp	62 <sup>b</sup>	Cook <i>et al.</i> (2007) <sup>[8]</sup>
Mùi tây	59 <sup>b</sup>	Cook <i>et al.</i> (2007) <sup>[8]</sup>
Cải thảo	10 <sup>b</sup>	Rzezutka <i>et al.</i> (2010) <sup>[22]</sup>
Quả mâm xôi	64,7 ± 13,0 <sup>a</sup>	Cook <i>et al.</i> (2006a) <sup>[9]</sup>
Hành trộn salad	46 <sup>b</sup>	Cook <i>et al.</i> (2007) <sup>[8]</sup>
Hành trộn salad	35 <sup>b</sup>	Rzezutka <i>et al.</i> (2010) <sup>[22]</sup>
Cải bắp trắng	4 - 47 <sup>b</sup>	Rzezutka <i>et al.</i> (2010) <sup>[22]</sup>

<sup>a</sup> Dựa trên độ thu hồi (ví sinh vật) đích

<sup>b</sup> Dựa trên việc thu hồi kiểm chứng tách chiết nội chuẩn

**Bào nang *Giardia***

Loại mẫu	Phần trăm thu hồi	Tài liệu tham khảo
Rau trộn	38 <sup>b</sup>	Cook <i>et al.</i> (2007) <sup>[8]</sup>
Rau diếp/cải bắp	16,7 ± 8,1 <sup>b</sup>	Amoros <i>et al.</i> (2010) <sup>[23]</sup>
Rau diếp (Gem)	31 <sup>b</sup>	Cook <i>et al.</i> (2007) <sup>[8]</sup>
Rau diếp (Iceberg)	65 <sup>b</sup>	Cook <i>et al.</i> (2007) <sup>[8]</sup>
Rau diếp (Romaine)	38 <sup>b</sup>	Cook <i>et al.</i> (2007) <sup>[8]</sup>
Xà lách hỗn hợp	53 <sup>b</sup>	Cook <i>et al.</i> (2007) <sup>[8]</sup>
Mùi tây	43 <sup>b</sup>	Cook <i>et al.</i> (2007) <sup>[8]</sup>
Hành trộn salad	38 <sup>b</sup>	Cook <i>et al.</i> (2007) <sup>[8]</sup>

<sup>a</sup> Dựa trên độ thu hồi đích

<sup>b</sup> Dựa trên việc thu hồi kiểm chứng tách chiết nội chuẩn.

## Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 12365 (ISO 16140), *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Xác nhận giá trị sử dụng phương pháp*
- [2] AMOROS I., ALONSO J.L., CUESTA G. *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts on salad products irrigated with contaminated water. *J. Food Prot.* 2010, **73** (6) pp. 1138-1140
- [3] OIE, WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. 2012), Chapter 2.9.4 – *Cryptosporidiosis*. pp 1190-1213. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Online version at [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.09.10\\_TOXO.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.10_TOXO.pdf)
- [4] ENVIRONMENT AGENCY. (2010). *The Microbiology of Drinking Water (2010) – Part 14 – Methods for the isolation, identification and enumeration of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts*. Available online at [http://www.environment-agency.gov.uk/static/documents/Research/Part\\_14-oct20-234.pdf](http://www.environment-agency.gov.uk/static/documents/Research/Part_14-oct20-234.pdf)
- [5] BIER J.W. Isolation of parasites on fruits and vegetables. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 1991, **22** ( ) pp. 144-145
- [6] BLACKBURN B.G., MAZUREK J.M., HLAVSA M., PARK J., TILLAPAW M., PARRISH M. *Cryptosporidiosis* associated with ozonated apple cider. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, **12** pp. 684-686
- [7] CAMPBELL A.T., GRON B., JOHNSEN S.E. 1997. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from high turbidity water sample concentrates. In: Proceedings of the 1997 International Symposium on Waterborne *Cryptosporidium* (eds: Fricker, C.R., Clancy, J.L., Smith, H.V.) American Water Works Association
- [8] COOK N., NICHOLS R.A., WILKINSON N., PATON C.A., BARKER K., SMITH H.V. Development of a method for detection of *Giardia duodenalis* cysts on lettuce and for simultaneous analysis of salad products for the presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, **73** (22) pp. 7388-7391
- [9] COOK N., PATON C.A., WILKINSON N., NICHOLS R.A., BARKER K., SMITH H.V. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: development and optimization of methods. *Int.J. Food Microbiol.* 2006a, **109** (3) pp. 215-221
- [10] COOK N., PATON C.A., WILKINSON N., NICHOLS R.A., BARKER K., SMITH H.V. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 2: validation. *Int.J. Food Microbiol.* 2006b, **109** (3) pp. 222-228

- [11] DI BENEDETTO M.A.,CANNOVA L.,DI PIAZZA F.,AMODIO E., BONO F.,CERAME G. Hygienic-sanitary quality of ready-to-eat salad vegetables on sale in the city of Palermo (Sicily). *Ig. Sanita Pubbl.* 2007, **63** (6) pp. 659-670
- [12] DI BENEDETTO M.A., DI PIAZZA F., OLIVERI R., CERAME G., VALENTI R., FIRENZE A. Development of a technique for recovering *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts from fresh vegetables. *Ann. Ig.* 2006, **18** (2) pp. 101-107
- [13] MACARISIN D., SANTIN M., BAUCHAN G., FAYER R. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts after storage of experimentally contaminated apples.*J. Food Prot.* 2010, **73** (10) pp. 1824-1829
- [14] MCCUIN R.M., BUKHARI Z., SOBRINHO J., CLANCY J.L. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation. *J. Microbiol. Methods.* 2001, **45** (2) pp. 69-76
- [15] RIPABELLI G., LEONE A., SAMMARCO M.L., FANELLI I., GRASSO G.M., MCLAUCHLIN J. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in experimentally contaminated lettuce using filtration, immunomagnetic separation, light microscopy, and PCR. *Foodborne Pathog. Dis.* 2004, **1** (4) pp.216-222.
- [16] ROBERTSON L.J., & FAYER R. *Cryptosporidium*. In: *Foodborne Protozoan Parasites*, (ROBERTSON L.J.,& SMITH H.V.eds.). Nova Publishers, 2012.
- [17] ROBERTSON L.J., & GJERDE B. Isolation and enumeration of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and *Ascaris* eggs from fruits and vegetables.*J. Food Prot.* 2000, **63** (6) pp. 775-778
- [18] ROBERTSON L.J., & GJERDE B. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway.*J. Food Prot.* 2001, **64** (11) pp. 1793-1798
- [19] ROBERTSON L.J., & GJERDE B. Factors affecting recovery efficiency in isolation of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from vegetables for standard method development.*J. Food Prot.* 2001, **64** (11) pp. 1799-1805
- [20] ROBERTSON L.J., & SMITH H.V. *Foodborne Protozoan Parasites*. Nova Publishers, 2012
- [21] ROCHELLE P.A., DE LEON R., JOHNSON A., STEWART M.H., WOLFE R.L. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, **65** (2) pp. 841-845
- [22] RZEUZKA A., NICHOLS R.A., CONNELLY L., KAUPKE A., KOZYRA I., COOK N. *Cryptosporidium* oocysts on fresh produce from areas of high livestock production in Poland. *Int. J. Food Microbiol.* 2010, **139** (1-2) pp. 96-101

- [23] SHIELDS J.M., MINJUNG LEE M., MURPHY H.R. Use of a common laboratory glassware detergent improves recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayentanensis* from lettuce, herbs and raspberries. *Int. J. Food Microbiol.* 2012, 153 (1-2) pp. 123-128
- [24] SMITH H. (2005). Development and validation of a standard method to detect *Cryptosporidium*, *Cyclospora* and other parasitic protozoa on fruit and vegetables: A final technical report by the Scottish parasite diagnostic laboratory to the food standards agency. FSA Project Code: B09009. Available at <http://www.foodbase.org.uk/results.php?freportid=781>
- [25] UTAAKER K.S., HUANG Q., ROBERTSON L.J. A reduced-cost approach for analyzing fresh produce for contamination with *Cryptosporidium* oocysts and/or *Giardia* cysts. *Food Res. Int.* 2015. DOI:10.1016/j.foodres.2015.05.010
-