

THIẾT LẬP PHƯƠNG PHÁP PCR ĐỂ XÁC ĐỊNH VI KHUẨN VEROTOXIGENIC E.COLI (VTEC) TRONG THỊT

Nguyễn Thị Thanh Thủy¹, Đỗ Ngọc Thúy²
và Nguyễn Bá Hiền³

TÓM TẮT

Phương pháp PCR phức với 3 loại cặp mồi (VT1, VT2 và eae), các điều kiện phản ứng như đã được thiết lập và chuẩn hóa trong nghiên cứu này có thể được áp dụng để xác định vi khuẩn Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC).

Từ khóa: Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC), PCR, Xác định

A study on PCR method to determine Verotoxigenic *E.coli* bacteria in meat

Nguyen Thi Thanh Thuy, Do Ngoc Thuy
and Nguyen Ba Hien

SUMMARY

Complex PCR method with three kinds of primer pairs (VT1, VT2 and eae), the reaction conditions as established and standardized in this study can be applied to determine the Verotoxigenic *Escherichia coli* bacteria (VTEC).

Key words: Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC), PCR, Determination.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

PCR (Polymerase Chain Reaction) là một kỹ thuật nhằm khuếch đại một đoạn DNA đặc hiệu nhờ 1 cặp mồi. Mồi sử dụng trong PCR thường là một cặp oligonucleotide, dài khoảng 15-30 nucleotide. Thành phần của PCR là: đoạn DNA đích, các mồi có trình tự bổ sung với DNA đích, hỗn hợp của 4 loại base và một DNA-polymerase phù hợp.

Quá trình khuếch đại là một sự lặp lại các chu kỳ của tăng và giảm nhiệt độ. Mỗi chu kỳ gồm 3 bước: dẫn xoắn sợi DNA kép, các mồi bắt cặp với từng sợi DNA đơn, tổng hợp sợi DNA mới nhờ DNA-polymerase. Theo đó, số lượng DNA tạo ra tăng lên 2^n với n là số chu kỳ (Saiki và cs, 1987).

Một trong những ứng dụng của PCR là xác định chính xác vi khuẩn. Đây là phương pháp nhanh, đặc hiệu, nhạy và tự động trong việc xác định các mầm bệnh là vi sinh vật. Nhiều tác giả đã sử dụng thành công phương pháp này trong xác định gen vt của VTEC. Phương pháp PCR xác định gen vt có thể phát hiện được dưới 10 VTEC trong tổng 10^9 coliform là một phương pháp phù hợp để phát hiện VTEC trong mẫu thực phẩm nghi ngờ.

Như một phương pháp chẩn đoán, PCR đã được phát triển để xác định gen vt ở E.coli phân lập từ các mẫu bệnh phẩm, thực phẩm và phân. Đặc biệt kỹ thuật PCR phức là một chẩn đoán có giá trị dịch tễ học (Nguyễn Bình Minh, 2004). Nhờ kỹ thuật này có thể tiến hành đồng thời số lượng lớn mẫu, tiết kiệm thời gian và sinh phẩm.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

- Mẫu thịt các loại (bò, lợn, gà) đã được xác định là âm tính với VTEC trong phản ứng PCR để tiến hành gây nhiễm với các chủng vi khuẩn đối chứng dương.
- Các chủng vi khuẩn đối chứng dương và âm do Viện nghiên cứu thú y (NVRI), Ba Lan; Phòng thí nghiệm tham chiếu *E.coli*, Tây Ban Nha (Laboratorio de Referencia de *E.coli* – LREC); Phòng thí nghiệm tham chiếu vi khuẩn *E.coli* của OIE, Canada (OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli*) cung cấp.
- Các loại môi trường, hóa chất dùng trong nuôi cấy, phân lập và giám định vi khuẩn E.coli

¹ Nghiên cứu sinh - Viện sau đại học, Đại học Nông nghiệp Hà Nội

² Viện Thú y. ³ Khoa thú y, Đại học Nông nghiệp Hà Nội

- Môi trường, hóa chất dùng trong phản ứng PCR và điện di sản phẩm PCR do hãng Fermentas sản xuất. Gồm: AMP x 5 buffer, dNTP stock, 50 x TAE, Taq-DNA polymerase, Primer, Gel loading bufer, Ethidium bromide.
- Các loại dụng cụ, trang thiết bị máy móc phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp

2.2.1- Phương pháp tiến hành phản ứng PCR

- + PCR đơn môi: mỗi phản ứng PCR sẽ được thực hiện với sự tham gia của một cặp môi đặc hiệu để phát hiện một gen nhất định (VT1, VT2 hoặc *eae*)
- + PCR phức (đa môi): sử dụng nhiều cặp môi trong một phản ứng PCR để phát hiện một số gen cần thiết. Trong nghiên cứu này là các gen VT1, VT2 và *eae*.
- + Xử lý DNA mẫu: DNA mẫu được tách chiết bằng phương pháp sốc nhiệt như sau: 1ml canh khuẩn được đun ở 100°C/30 phút, đông lạnh ở -20°C/qua đêm, ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút. Chất trong ở trên được tách riêng và sử dụng làm DNA mẫu.

2.2.2- Phương pháp xác định độ đặc hiệu của phản ứng PCR

Độ đặc hiệu của phản ứng PCR được xác định bằng cách kiểm tra với 10 chủng VTEC đối chứng dương và 10 chủng đối chứng âm với các thông tin về đặc tính của một số yếu tố gây bệnh đã được công bố, sử dụng phản ứng PCR phức.

2.2.3- Phương pháp xác định độ nhạy của phản ứng PCR

Tiến hành cấy 1 khuẩn lạc của mỗi chủng vi khuẩn vào lọ đựng 20ml môi trường (LB, mTSB và BHI). sau 20 giờ ủ ở 37°C, tiến hành pha loãng canh khuẩn theo cơ số 10 để được các nồng độ pha loãng thích hợp (10^{-1} , 10^{-2} , ..., 10^{-8}), đếm số trên môi trường thạch máu, đồng thời tiến hành các bước tách DNA mẫu từ tất cả các nồng độ pha loãng (kể cả canh khuẩn ban đầu) để dùng cho phản ứng PCR.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Với những trường hợp bệnh ở người và động vật có liên quan tới VTEC, trong đó có cả những bệnh gây nguy hiểm tới tính mạng con người như hội chứng huyết niệu (HUS), thực tế đòi hỏi phải có một phương pháp nhạy và đặc hiệu nhằm phát hiện vi khuẩn này. Trong đó, PCR đã và đang được đánh giá là phương pháp chính xác, nhanh và tiện dụng nhất để phát hiện các mẫu thực phẩm hoặc mẫu phân có chứa VTEC thông qua xác định gen quy định các yếu tố độc lực của vi khuẩn này (Paton A.W. và J.C.Paton, 2002)

3.1. Thiết lập, chuẩn hóa phương pháp PCR

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng một phương pháp đa môi nhằm xác định 3 loại gen độc lực của các chủng VTEC đối chứng, từ đó áp dụng đối với các chủng phân lập được. Thí nghiệm tiến hành với 3 chủng VTEC, gồm 2 chủng đối chứng dương (FD523, FD636) và 1 chủng đối chứng âm (C-600). DNA mẫu là một lượng nhỏ khuẩn lạc của vi khuẩn đã được nuôi cấy trên đĩa thạch máu cừu (37°C/24 giờ).

Môi của phản ứng được thiết kế dựa vào chuỗi gen mã hoá sinh tổng hợp protein của độc tố VT1, VT2 và protein intimin quy định đặc tính xâm nhập và bám dính của VTEC. Trình tự các môi và các sản phẩm tương ứng của chúng tạo ra được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự môi dùng để xác định các gen VT1, VT2 và *eae*

Gen đích	Ký hiệu primers	Chuỗi primers (5' - 3')	Kích cỡ sản phẩm (bp)
VT1	VT1-F	5' - CAG TTA ATG TGG TGG CGA AG - 3'	894
	VT1-R	5' - CTG CTA ATA GTT CTG CGC ATG - 3'	
VT2	VT2-F	5' - CTT CGG TAT CCT ATT CCC GG - 3'	481
	VT2-R	5' - GGA TGC ATC TCT GGT CAT TG - 3'	
Eae	eae-F	5' - ACG TTG CAG CAT GGG TAA CTC - 3'	816
	eae-R	5' - GAT CGG CAA CAG TTT CAC CTG - 3'	

Bảng 2. Thành phần các chất trong phản ứng PCR dùng để xác định các gen VT1, VT2 và eae

Thành phần	Thể tích (μl)	Nồng độ
Môi xuôi	1+1+1	3,2 μM /μl
Môi ngược	1+1+1	3,2 μM /μl
Dung dịch đệm AMP x 5 (Fermentas) gồm: + 750 mM Tris - HCl (pH=8) + 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ + 0,1% (v/v) Tween 20 + dNTPs + 2 mM MgCl ₂	5	-
Taq – polymerase (Fermentas)	0,62 μl	500 UI (1 U/1 μl)
DNA mẫu	thích hợp	
Nước khử ion	vừa đủ 25 μl	-
Tổng cộng	25 μl	-

Bảng 3. Các chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR dùng để xác định gen VT1, VT2 và eae

Các giai đoạn của phản ứng	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Số chu kỳ
Giai đoạn tiền biến tính	94	5	1
Giai đoạn biến tính	94	1	30
Giai đoạn bắt cặp	50	1	
Giai đoạn tổng hợp	72	1	
Giai đoạn kéo dài	72	7	1

Ban đầu, phản ứng PCR đơn được thực hiện với từng cặp mỗi riêng biệt. Sau đó, phản ứng được thực hiện với sự phối hợp đồng thời của 3 cặp mỗi. Kết quả thể hiện bảng 4.

Bảng 4. Kết quả thử nghiệm phản ứng PCR đơn và đa mỗi để phát hiện một số gen độc lực của VTEC

Các chủng kiểm tra	PCR đơn mỗi			PCR phức (đa mỗi)		
	VT1	VT2	eae	VT1	VT2	eae
FD523	+	+	-	+	+	-
FD636	+	+	+	+	+	+
C-600	-	-	-	-	-	-

- Phân tích sản phẩm: Các sản phẩm của phản ứng PCR được tiến hành chạy điện di trên thạch agarose 2% trong dung dịch 1 x TAE với hiệu điện thế 50V trong 30 phút. Đọc kết quả và chụp ảnh bằng hệ thống Gel Doc 2000. Ảnh được lưu giữ lại và được tiến hành xử lý kết quả khi cần thiết.

Kết quả cho thấy: Phản ứng PCR phức cho các sản phẩm riêng biệt và ổn định như trong phản ứng với từng cặp mỗi đơn. Ngoài ra, phản ứng PCR phức còn thể hiện một số ưu điểm khác: tiết kiệm thời gian, công lao động, đặc biệt là tiêu hao vật tư, hóa chất cho phản ứng cũng giảm đáng kể. Do đó, để xác định vi khuẩn VTEC trong thịt nên sử dụng phản ứng PCR phức.

3.2. Kết quả thực hiện phản ứng PCR với các chủng đối chứng

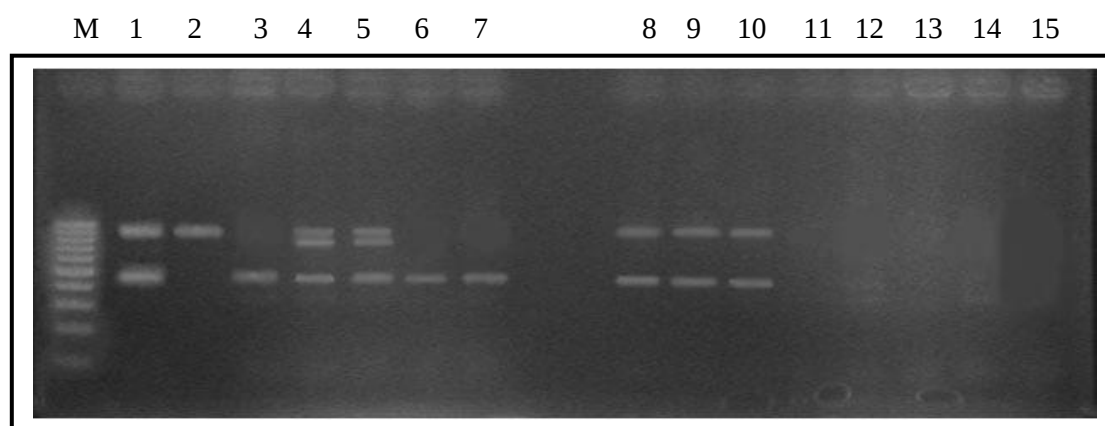
Phương pháp PCR dùng để xác định 2 loại gen sản sinh độc tố (VT1, VT2) và yếu tố bám dính intimin (eae) đã được thiết lập và chuẩn hóa với các DNA mẫu là các chủng vi khuẩn đối chứng dương và đối chứng âm. Các chủng E.coli đối chứng dương (n=10) (do một số phòng thí nghiệm tham chiếu về vi khuẩn E.coli cung cấp) đã được xác định chắc chắn có mang từ 2-3 trong số 3 loại gen (VT1, VT2, eae). Các chủng đối chứng âm (n=10) gồm có: vi khuẩn E. coli (C-600,

FV847a, FV2289, FV2586, FV2593), *Salmonella typhumirium* (FD675), *P. multocida* (PM-VT3), *S. suis* (HN-25), *S. aureus* (FD231), *C. perfringens* (BCD6). Kết quả thực hiện phản ứng PCR phức đã được chuẩn hóa dùng để xác định 3 gen (VT1, VT2 và eae) với 10 chủng đối chứng dương và 10 chủng đối chứng âm được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5: Kết quả thực hiện phản ứng PCR đa môi với các chủng đối chứng

Ký hiệu chủng		Đặc tính về một số yếu tố gây bệnh của vi khuẩn <i>E. coli</i>	Kết quả phản ứng PCR
Đối chứng dương	<i>E. coli</i> FD523	VT1/VT2	VT1/VT2
	<i>E. coli</i> FD526	VT1	VT1
	<i>E. coli</i> FD528	VT2	VT2
	<i>E. coli</i> FD635	VT1/VT2/eae/Hly	VT1/VT2/eae/Hly
	<i>E. coli</i> FD636	VT1/VT2/eae/Hly	VT1/VT2/eae/Hly
	<i>E. coli</i> BDL9.1	VT2	VT2
	<i>E. coli</i> BKT29.1	VT2	VT2
	<i>E. coli</i> E4	VT1/VT2	VT1/VT2
	<i>E. coli</i> E7	VT1/VT2	VT1/VT2
	<i>E. coli</i> E41	VT1/VT2	VT1/VT2
Đối chứng âm	<i>E. coli</i> (C-600) (K-12)	-	-
	<i>E. coli</i> FV847a	F4/STa/STb/LT	-
	<i>E. coli</i> FV2289	F18/STa/STb/VT2v	-
	<i>E. coli</i> FV2586	F4/STb/LT	-
	<i>E. coli</i> FV2593	F18/STa/STb/VT2v	-
	<i>S. typhumirium</i> (FD675)	-	-
	<i>P. multocida</i> (PM-VT3)	-	-
	<i>S. suis</i> (HN-25)	-	-
	<i>S. aureus</i> (FD231)	-	-
	<i>C. perfringens</i> (BCD6)	-	-

Như vậy, có thể kết luận: phản ứng PCR đã được chuẩn hóa trong nghiên cứu này dùng để xác định 3 loại gen có độ đặc hiệu là 100% khi được xem xét thử nghiệm trên các chủng đối chứng.



Ảnh 1. Các sản phẩm của phản ứng PCR với các chủng đối chứng dương và âm sau quá trình điện di

Ghi chú: M: 100 bp marker. Giếng 1: FD523 (VT1/VT2). Giếng 2: FD526 (VT1). Giếng 3: FD528 (VT2). Giếng 4: FD635 (VT1/VT2/eae). Giếng 5: FD636 (VT1/VT2/eae). Giếng 6: BDL9.1 (VT2). Giếng 7: BKT29.1(VT2). Giếng 8: E4 (VT1/VT2). Giếng 9: E7 (VT1/VT2). Giếng 10: E41 (VT1/VT2). Giếng 11, 12, 13, 14, 15: Các chủng đối chứng âm.

3.3. Kết quả xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp PCR dùng để xác định VTEC

Kỹ thuật PCR hiện đang được đánh giá là một phương pháp có độ nhạy và độ đặc hiệu rất cao (Lê Thị Tuyết Trinh, 2007). Sở dĩ có độ nhạy và độ đặc hiệu cao như vậy là do nguyên lý của PCR sử dụng cặp mồi gắn đặc hiệu vào đoạn DNA đích. Khi thực hiện phản ứng PCR, người ta nhận thấy độ nhạy của phản ứng cũng chính là giới hạn phát hiện của phản ứng. Giới hạn này chính là nồng độ của đoạn DNA đích trong hỗn hợp phản ứng. Bên cạnh đó, độ đặc hiệu của phản ứng PCR là độ đặc hiệu của các cặp mồi sử dụng. Cặp mồi phải được lựa chọn sao cho có khả năng ghép cặp tốt với trình tự ở 2 đầu của đoạn DNA đích. Kết quả xác định độ đặc hiệu ghi nhận được còn cho thấy đoạn DNA đích được lựa chọn để khuếch đại có trình tự các nucleotide trong đoạn gen tương đối ổn định và xuất hiện với tần số cao ở các chủng vi khuẩn cần nghiên cứu nhưng lại không thấy ở các chủng vi khuẩn khác.

Bảng 6: Kết quả xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng PCR trên môi trường nuôi cấy

Nồng độ pha loãng	Kết quả					
	FD523 ($\times 10^8$ VK/ml)			FD636 ($\times 10^8$ VK/ml)		
	LB (6,26)	m-TSB (6,6)	BHI (2,375)	LB (5,70)	m-TSB (6,2)	BHI (2,508)
CTBD	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	-	-	+	-	-	+
10^{-6}	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: CTBD: Canh trùng ban đầu

+: Phản ứng dương tính với cả 3 loại gen VT1, VT2 và eae

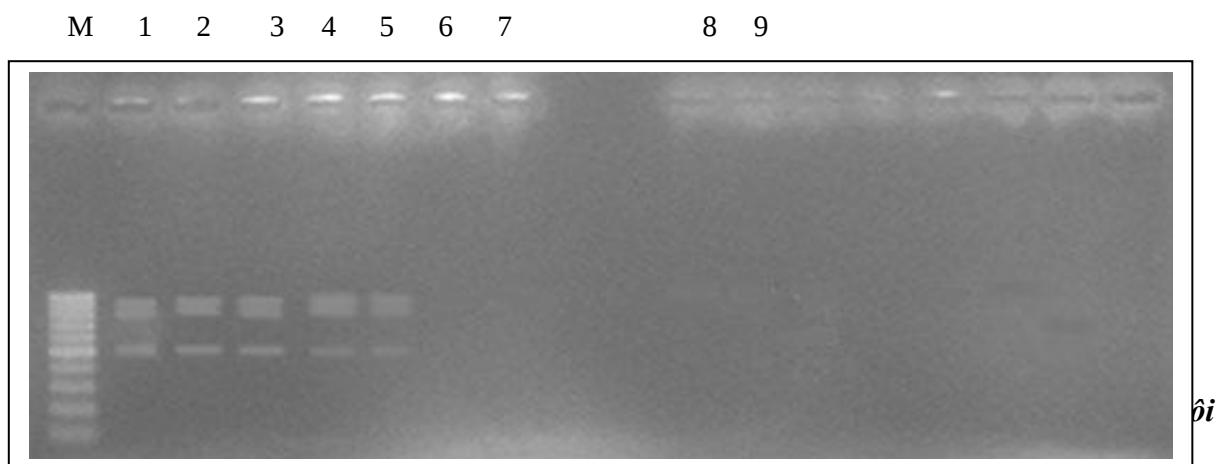
-: Phản ứng âm tính với cả 3 loại gen VT1, VT2 và eae

Kết quả bảng 6 cho thấy:

- Về độ đặc hiệu của phản ứng: DNA được tách ra từ 3 loại môi trường nuôi cấy đều cho các phản ứng PCR dương tính với độ đặc hiệu là 100% với cả 3 loại gen VT1, VT2 và eae.

- Về độ nhạy của phản ứng: với cả 3 loại môi trường, ngưỡng giới hạn dưới hay mật độ của vi khuẩn để từ đó có thể dùng để phát hiện được VTEC trong môi trường bằng phản ứng PCR là tương đương nhau, $\sim 2,3-6,6 \times 10^4$ vi khuẩn/ml.

Trong một nghiên cứu được tiến hành năm 2007, tác giả Lê Thị Tuyết Trinh đã tiến hành xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng PCR nhằm hoàn thiện hệ thống PCR phức để xác định các *E.coli* gây tiêu chảy. Với các cặp mồi VT1, VT2 và eae dùng để xác định nhóm EHEC, tác giả đã thu được kết quả về độ nhạy của phản ứng PCR phức là 10^5 vi khuẩn/ml. So sánh với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, phản ứng PCR của chúng tôi có độ nhạy cao hơn do có thể phát hiện được số lượng $2,3-6,6 \times 10^4$ vi khuẩn/ml.



Ghi chú: M: 100 bp marker. Giếng 1: N/c. Giếng 2: nồng độ pha loãng 10^{-1} (VT1/VT2/eae). Giếng 3: nồng độ pha loãng 10^{-2} (VT1/VT2/eae). Giếng 4: nồng độ pha loãng 10^{-3} (VT1/VT2/eae). Giếng 5: nồng độ pha loãng 10^{-4} (VT1/VT2/eae). Giếng 6: nồng độ pha loãng 10^{-5} . Giếng 7: nồng độ pha loãng 10^{-6} . Giếng 8: nồng độ pha loãng 10^{-7} . Giếng 9: nồng độ pha loãng 10^{-8} .

3.4. Kết quả xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp PCR dùng để xác định VTEC trong mẫu thịt sạch

- Thí nghiệm được bố trí như sau:

+ Chọn 6 mẫu thịt (bò, lợn, gà) đã được xác định là âm tính trong phản ứng PCR để tiến hành gây nhiễm với các chủng vi khuẩn đối chứng dương.

+ 25 g thịt đã được cắt nhỏ và cho vào 225 ml môi trường m-TSB.

+ Môi trường (m-TSB) đã nuôi cấy vi khuẩn chủng FD523 và FD636 ở $37^{\circ}\text{C}/24$ giờ. Pha loãng thành các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-8}

Kết quả được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7: Kết quả xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng PCR trong mẫu thịt sạch

Nồng độ pha loãng (m-TSB)	Kết quả					
	FD523 ($6,6 \times 10^8$ VK/ml)			FD636 ($6,2 \times 10^8$ VK/ml)		
	Lợn	Bò	Gà	Lợn	Bò	Gà
CTBD	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-

Kết quả bảng 7 cho thấy:

- Về độ đặc hiệu của phản ứng: DNA được tách ra từ môi trường m-TSB có các mẫu thịt đều cho các phản ứng PCR dương tính với độ đặc hiệu là 100% với cả 3 loại gen VT1, VT2 và eae.

- Về độ nhạy của phản ứng: Với cả 3 loại thịt, ngưỡng giới hạn dưới (Lower limit) về số lượng của vi khuẩn VTEC để có thể phát hiện được trong môi trường có các mẫu thịt và đã được gây nhiễm với số vi khuẩn đạt nồng độ cuối cùng là $6,6 \times 10^6$ vi khuẩn/ml đối với chủng FD523 và $6,2 \times 10^6$ vi khuẩn/ml đối với chủng FD636. Hay nói cách khác, số lượng vi khuẩn VTEC nhiễm

trong 25 g thịt tươi phải đạt ở mức $\sim 6,2 - 6,6 \times 10^6$ vi khuẩn thì mới có thể xác định được bằng phương pháp PCR như đã được chuẩn hóa trong nghiên cứu này.

IV. KẾT LUẬN

- Kết quả nghiên cứu cho thấy phản ứng PCR phức cho các sản phẩm riêng biệt và ổn định như trong phản ứng với từng cặp môi đơn. Ngoài ra, phản ứng PCR phức còn thể hiện một số ưu điểm khác. Do đó, để xác định vi khuẩn VTEC trong thịt nên sử dụng phản ứng PCR phức.
- DNA được tách ra từ môi trường m-TSB có các mẫu thịt đều cho các phản ứng PCR dương tính với độ đặc hiệu là 100% với cả 3 loại gen VT1, VT2 và eae.
- Số lượng vi khuẩn VTEC nhiễm trong 25 g thịt tươi phải đạt ở mức $\sim 6,2 - 6,6 \times 10^6$ vi khuẩn thì mới có thể xác định được bằng phương pháp PCR như đã được chuẩn hóa trong nghiên cứu này.
- Phương pháp PCR phức với 3 loại cặp môi (VT1, VT2 và eae) và các điều kiện phản ứng như đã được thiết lập và chuẩn hóa trong nghiên cứu này có thể được áp dụng để xác định vi khuẩn VTEC

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Bình Minh (2004), “Kỹ thuật PCR đa môi xác định các loại *Escherichia coli* gây bệnh”, *Tạp chí Y học Việt Nam*, số 7, *Tổng hội y dược học Việt Nam*, tr. 1 - 4.
2. Lê Thị Tuyết Trinh (2007), *Phát triển và hoàn thiện hệ thống PCR đa môi xác định trực tiếp các Escherichia coli gây tiêu chảy từ phân*, Luận văn thạc sỹ y học, Đại học Y Hà Nội, Hà Nội.
3. Paton J.C. and A.W.Paton (2002), “Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* and *saa*”, *Journal of clinical microbiology*, Vol.40, No.1, p.271-274.
4. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K. B. and Erlich H. A. (1987), “Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase”, *Science*, 239, p.487-491.