

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT PCR ĐA MÔI PHÁT HIỆN VIBRIO CHOLERAЕ GÂY BỆNH TẢ

NGUYỄN LĨNH TOÀN - Học viện Quân y

TÓM TẮT

Bệnh tả do *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính đường tiêu hóa. Phát hiện *V. cholerae* trong bệnh phẩm và môi trường có vai trò quan trọng trong chẩn đoán, theo dõi điều trị cũng như giám sát dịch tả. Trong nghiên cứu này chúng tôi phát triển kỹ thuật PCR đa môi phát hiện hai gen mã hóa độc tố *ctxA* và *tcpA* của *V. cholerae*. Tối ưu hóa điều kiện phản ứng PCR đa môi đối với hai gen đích *ctxA* và *tcpA* được thực hiện trên các chủng *V. cholerae* phân lập. Độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật PCR đa môi là 100% và ngưỡng phát hiện của phản ứng là 36fg DNA mẫu của môi trường nuôi cấy chủng.

Từ khóa: *ctxA*; *tcpA*; *Vibrio cholerae*; PCR đa môi.

SUMMARY

Cholera caused by toxigenic *V. cholerae* is an acute intestinal infection. Detections of *V. cholerae* in the patient and environmental samples are the major role for diagnostic and follow up for treatment and the monitoring the epidemic disease. In this study we have developed a multiplex-PCR assay for the detection of *ctxA* and *tcpA* toxigenic-genes of *V. cholerae*. To examine the standard conditions, sensitive and specificity of multiplex-PCR assay have been evaluated by using known *V. cholerae* strains. The sensitive and specific of multiplex-PCR assay for detection of toxigenic *V. cholerae* were 100% and the low detection threshold of the multiplex-PCR assay is 36fg DNA template from cell culture mediums.

Key words: *ctxA*; *tcpA*; *Vibrio cholerae*; multiplex-PCR.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn tả (*Vibrio cholerae*) là tác nhân gây dịch tả cấp tính ở các nước đang phát triển trong đó có Việt Nam. Loài *V. cholerae* thuộc giống *Vibrio*, họ *Vibrionaceae*. Các chủng của vi khuẩn tả có kháng nguyên lông (H) giống nhau, tuy nhiên dựa vào sự khác nhau của kháng nguyên thân (O), *V. cholerae* được phân chia thành hơn 100 nhóm. Những chủng chính liên quan gây bệnh tả là các chủng *V. cholerae* O1 và O139 (3). Đối với các chủng *V. cholerae* sống trong môi trường tự nhiên việc phân lập bằng các

phương pháp nuôi cấy thông thường là rất khó khăn. Trong khi đó, nước có vai trò quan trọng trong sự lan truyền bệnh tả. Người ta thấy rằng, các chủng *V. cholerae* O1 và O139 ở trong môi trường nước sống sót bằng chuyển từ trạng thái hoạt động sang ít hoạt động nên rất khó nuôi cấy. Ở trạng thái này vi khuẩn giữ lại được khả năng tồn tại độc lập, duy trì khả năng lây nhiễm với sự toàn vẹn của các gen gây bệnh của vi khuẩn trong thời gian trên một năm (2). Việc xác định nhanh và chính xác được các *V. cholerae* tồn tại trong nước sinh hoạt và trong môi trường có vai trò quan trọng trong quản lý nguồn bệnh và bảo vệ sức khỏe cộng đồng. Trong khi đó phương pháp nuôi cấy thông thường được dùng phân lập các *V. cholerae* chuyển trạng thái ít hoạt động trong môi trường là ít hiệu quả (4,5). Gần đây các phương pháp sinh học phân tử như PCR, PCR đa môi hứa hẹn là phương pháp phù hợp xác định được các chủng tả gây bệnh tồn tại trong môi trường và đã được áp dụng hiệu quả trên thế giới (Bhanumathi et al., 2003; Kapley and Purohit, 2001). Trong nghiên cứu này chúng tôi áp dụng kỹ thuật PCR đa môi nhân các gen đích *ctxA* và *tcpA* xác định *V. cholerae* gây bệnh tả. Gen đích *ctxA* và *tcpA* là những gen được biết có vai trò chia khóa mã hóa các protein độc tố tả gây bệnh nhất là của các chủng tả O1 và O139 (3). Các nghiên cứu gần đây cho thấy *ctxA* là gen mã hóa dưới đơn vị A của độc tố tả (cholera toxin, CT) đóng vai trò chính của độc tố tả. Trong khi đó, *tcpA* mã hóa độc tố lông đồng điều hòa có vai trò quan trọng trong sự xâm nhập của vi khuẩn vào màng nhầy ruột vật chủ (6,7). Điều quan trọng là cả *ctxA* và *tcpA* đều là hai gen phổ biến ở các chủng tả gây bệnh dành được từ các vi khuẩn tồn tại trong môi trường nước (2,6). Vì vậy, môi trường nước tự nhiên có thể có vai trò quan trọng trong sinh thái, lây truyền và dịch tễ học của vi khuẩn tả (2,6,7).

Ứng dụng kỹ thuật PCR đa môi khuếch đại đồng thời các gen mã hóa độc tố tả như *ctxA* và *tcpA* đã trở thành công cụ hữu hiệu cho kết quả nhanh chóng và chính xác chẩn đoán cả các chủng tả gây bệnh trong các mẫu lâm sàng và trong môi trường. Gần đây

chúng tôi đã thành công trong việc tối ưu hóa kỹ thuật PCR đơn mỗi xác định các chủng tả gây bệnh cho kết quả độ nhạy và đặc hiệu 100% và ngưỡng phát hiện chỉ vài chục vi khuẩn gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm (1). Trong nghiên cứu này chúng tôi phát triển thêm một bước áp dụng đồng thời nhiều cặp mỗi trong một phản ứng PCR xác định các gen mã hóa độc tố tả ctxA và tcpA chẩn đoán vi khuẩn tả gây bệnh.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu và đối tượng nghiên cứu.

-Vi khuẩn. gồm 30 chủng *V. cholerae* O1 gây bệnh tả được nuôi cấy, phân lập và sử dụng làm mẫu chuẩn để đánh giá độ nhạy của phản ứng. Các chủng *Salmonella* gây bệnh thương hàn gồm *Salmonella typhi*, *Salmonella typhi* A, *Salmonella typhi* B, *Salmonella typhi* C và *E. Coli* được sử dụng để đánh giá độ đặc hiệu của kỹ thuật và làm chứng âm (1).

- Môi trường tăng sinh *V. cholerae*: Môi trường peptone kiềm (pH = 8,5)

2.3. Môi. Trình tự các primer dùng chẩn đoán *V. cholerae* gây bệnh tả được mô tả trong bảng 1 (5,7).

Bảng 1. Trình tự các môi nhân đồng thời gen ctxA và tcpA của *V. cholerae*.

Môi	Trình tự môi	Kích thước (bp)	Vị trí nucleotid
ctxA-F	5'-CTCAGACGGGATTTGTTAGGCACG-3'	302	309-332
ctxA-R	5'-TCTATCTCTGTAGCCCTATT-3'		610-590
tcpA-F	5'-GAAGAAGTTTGTAAAAGAAGAACAC-3'	472	83-107
tcpA-R	5'-GAAAGCACCTTCTTTCACGTTG-3'		554-533

Để chẩn đoán *V. cholerae* gây bệnh tả phản ứng PCR sử dụng các cặp mỗi ctxA-F và ctxA-R (302 bp) và cặp mỗi tcpA-F và tcpA-R (472 bp). Do sản phẩm PCR của từng gen đích khác nhau nên phân biệt được trên gel agarose.

2.4. Phản ứng PCR đa môi. Phản ứng PCR đa môi được thực hiện một vòng xác định đồng thời hai gen mã hóa độc lực của *V. cholerae* gây bệnh tả trong mẫu bệnh phẩm, enzyme sử dụng cho phản ứng PCR đa môi là Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, NEB). Thành phần của phản ứng PCR được tóm tắt trong bảng 2.

Bảng 2. Thành phần của phản ứng PCR đa môi phát hiện *V. cholerae* gây bệnh tả

Thành phần phản ứng PCR đa môi	Thể tích (μl)	Nồng độ cuối cùng
Nước khử ion	15,3	
PCR bufer (10X)	2,5	1x
dNTP mix (2,5 mM)	2	0,2 mM
Primer ctxA-F (10pmol/l)	0,5	0,5 μM
Primer ctxA-R (10pmol/l)	0,5	0,5 μM
Primer tcpA-R (10pmol/l)	0,5	0,5 μM
Primer tcpA-F (10pmol/l)	0,5	0,5 μM
Taq polymerase (NEB) (5U/μl)	0,2	1 đơn vị
DNA tổng số	3	
Tổng số	25	

Nhiệt độ và thời gian gắn mỗi của phản ứng PCR đa môi được xác định bằng gradient nhiệt độ và thời gian gắn mỗi với 35 chu kỳ nối tiếp nhau, mỗi chu kỳ qua 3 giai đoạn cơ bản: biến tính DNA, gắn mỗi và tổng hợp. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy GeneAmp PCR System 9700 và iCycler. Sản phẩm

2. Phương pháp nghiên cứu.

2.1. Nuôi cấy và tăng sinh. Các chủng *V. cholerae* được tăng sinh trên môi trường Peptone kiềm (pH = 8,5) 6 giờ ở nhiệt độ 37°C, lắc 230 vòng/phút. Dịch nuôi cấy chứa *V. cholerae* được dùng tách và tinh sạch DNA vi khuẩn để dùng cho các bước tiếp theo. Các chủng *Salmonella* và *E. coli* được tăng sinh qua đêm trên môi trường chuyên biệt. Nuôi cấy và tăng sinh vi khuẩn được thực hiện tại Khoa Vi sinh vật và Trung tâm sinh y dược học, Học viện Quân y (1).

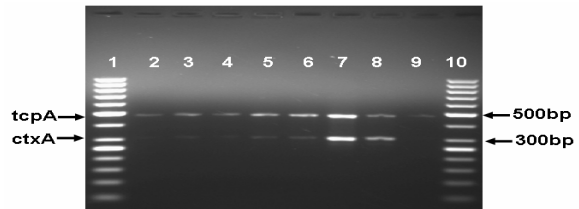
2.2. Tách và tinh sạch ADN vi khuẩn. DNA của *V. cholerae* được tách từ môi trường tăng sinh sau tăng sinh được pha loãng 10 lần trong nước khử ion (tỷ lệ 1:9), đun ở 95°C trong 10 phút, ly tâm 12.000 vòng trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C. Dịch nổi được kiểm tra nồng độ DNA và bảo quản ở -20°C đến khi sử dụng.

cDNA được điện di trên gel agarose 1,5% nhuộm ethidium bromide (0,5 mg%) trong môi trường đệm 1x TBE, 110 Vôn, dòng 80 mA, trong 45 phút, quan sát và chụp ảnh bằng máy soi Gel-Dolphil.

KẾT QUẢ

1. Tối ưu hóa nhiệt độ gắn mỗi.

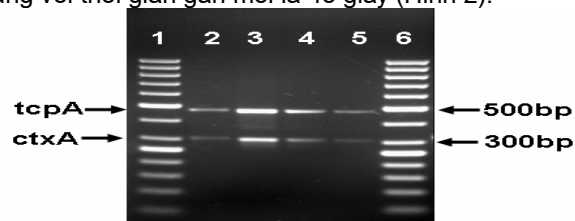
Thực hiện tối ưu hóa kỹ thuật PCR đa môi cho 2 gen đích ctxA và tcpA chúng tôi chọn khoảng nhiệt độ 49°C đến 60°C với các điểm đặt nhiệt là 49°C; 49.9°C; 51.2°C; 53.2°C; 56.1°C; 58.1°C; 59.4°C và 60°C tiến hành dùng các mẫu DNA là các chủng *V. cholerae* được nuôi cấy phân lập. Kết quả cho thấy sản phẩm PCR đa môi rõ nét nhất ở dãy số 7 tương ứng với nhiệt độ 58.1 độ C (Hình 1.). Kết quả thí nghiệm được lặp lại 03 lần đều cho kết quả ổn định, nhiệt độ gắn mỗi tối ưu là 58.1°C.



Hình 1. Hình ảnh điện di của sản phẩm PCR sau khi thực hiện gradient nhiệt độ nhân gen ctxA và tcpA của *V. cholerae*. Cột 1 và 10, thang chuẩn DNA; cột số 2-9 theo thứ tự điểm đặt nhiệt là 49°C; 49.9°C; 51.2°C; 53.2°C; 56.1°C; 58.1°C; 59.4°C và 60°C

2. Tối ưu thời gian gắn mỗi.

Tìm thời gian gắn mỗi phù hợp cho phản ứng PCR đa mỗi nhân gen *ctxA* và *tcpA* được thực hiện với mốc thời gian 30, 45, 60 và 90 giây. Kết quả cho thấy sản phẩm PCR đa mỗi của rõ nét nhất ở cột số 3, tương ứng với thời gian gắn mỗi là 45 giây (Hình 2).



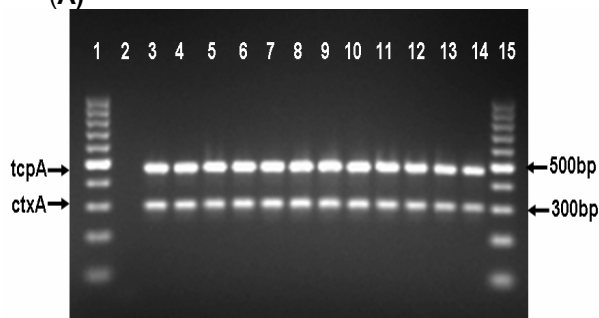
Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR sau khi thực hiện gradient tìm thời gian gắn mỗi nhân gen *ctxA* và *tcpA* của *V. cholerae*. Cột số 1 và 6, thang DNA; cột số 2-5, mốc thời gian theo thứ tự 30, 45, 60 và 90 giây.

Như vậy, chu trình nhiệt phù hợp nhất để thực hiện phản ứng PCR đa mỗi nhân hai gen đích đặc hiệu phát hiện *V. cholerae* gây bệnh tả là: 95°C x 3 phút, (95°C x30 giây, 58.1°C x 45 giây và 72°C x 30 giây) x 35 chu kỳ, kết thúc 72°C x 7 phút

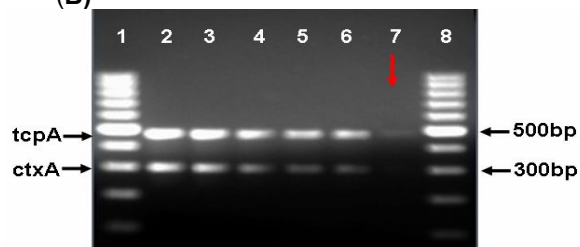
3. Đánh giá độ nhạy và đặc hiệu của phản ứng PCR đa mỗi phát hiện *V. cholerae* gây bệnh tả.

- Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng PCR đa mỗi phát hiện *V. cholerae* gây bệnh tả được thực hiện trên các chủng *V. cholerae* đã nuôi cấy phân lập và các chủng *Samonella*, *E. Coli* chuẩn (Hình 3).

(A)



(B)



Hình 3. Hình ảnh minh họa độ nhạy (A) và ngưỡng phát hiện (B) của phản ứng PCR đa mỗi phát hiện *V.cholerae* gây bệnh tả. (A) Cột 1 và 15, thang chuẩn DNA; cột số 2, chứng âm; cột từ 3 đến 14, mẫu chuẩn *V.cholerae*. (B) Ngưỡng phát hiện cột 7 là 36 fg DNA tương đương 10 tế bào.

Thực hiện phản ứng PCR đa mỗi trên 30 chủng chuẩn *V. cholerae* kết quả cho thấy 30/30 dương tính (100%). Để xác định ngưỡng phát hiện của phản ứng PCR đa mỗi nhân hai gen đích của *V. cholerae* với

nồng độ DNA của *V. cholerae* hòa loãng dần. Kết quả cho thấy nồng độ DNA tối thiểu phản ứng PCR đa mỗi phát hiện được là 36 fg tương đương khoảng 10 tế bào vi khuẩn.

- Đánh giá độ đặc hiệu, chúng tôi sử dụng các chủng chuẩn *Samonella* và *E. Coli* (30 chủng) thực hiện phản ứng PCR đa mỗi phát hiện *V. cholerae* theo đúng qui trình đã nghiên cứu mô tả trên và sử dụng chứng dương là chủng vi khuẩn tả đã phân lập. Kết quả 30/30 mẫu đều cho kết quả âm tính (Hình 4, Bảng 3).



Hình 4. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1.5% đối với gen đích *ctxA* và *tcpA* của *V. cholerae*. Cột 1 và 10, thang chuẩn DNA; cột số 9, chứng dương; cột từ 2 đến 8, mẫu âm.

Bảng 3. Độ nhạy và đặc hiệu của kỹ thuật PCR đa mỗi phát hiện *V. cholerae*

Kết quả	Mẫu DNA		Tổng
	<i>V. cholerae</i> (+)	<i>V. cholerae</i> (-)	
PCR đa mỗi (+)	30	0	30
PCR đa mỗi (-)	0	30	30
Cộng	30	30	60

* Độ nhạy: Se (Sensitive)=(30/30)x100%=100%.

* Độ đặc hiệu: Sp (Specific)=(30/30)x100%=100%.

Kỹ thuật PCR đối với gen đích *ctxA* và *tcpA* có độ nhạy 100% và độ đặc hiệu 100% có thể được sử dụng xác định sự có mặt của *V. cholerae* trong mẫu bệnh phẩm.

BÀN LUẬN

1. Tìm điều kiện nhiệt độ và thời gian gắn mỗi phù hợp cho phản ứng PCR.

Đối với với phản ứng PCR đa mỗi, yếu tố quan trọng là các mỗi. Các mỗi cần được thiết kế tránh không bắt cặp bổ sung với nhau và khoảng nhiệt độ Tm chênh nhau giữa các mỗi không nhiều hoặc tương đương về tỷ lệ GC. Điều kiện phản ứng PCR đóng vai trò quan trọng đó là nhiệt độ và thời gian gắn mỗi, nồng độ MgCl₂... mặc dù nguyên lý PCR khá đơn giản, nhưng không có công thức chung cho một phản ứng PCR đa mỗi cụ thể nào. Vì vậy, khi thực hiện phản ứng PCR đa mỗi chúng ta cần phải thăm dò, tìm kiếm qui trình phi hợp khi áp dụng cụ thể (5). Để dò tìm các điều kiện của phản ứng PCR chúng ta thường sử dụng hệ thống PCR có chương trình gradient. Cố định các điều kiện khác và cho điều kiện dò tìm thay đổi trong giới hạn nhất định. Trong thí nghiệm này chúng tôi tìm nhiệt độ và thời gian gắn mỗi của phản ứng PCR đa mỗi nhân đồng thời gen *ctxA* và *tcpA* của *V. cholerae* (5,7). Trên cơ sở nhiệt độ nóng chảy Tm của mỗi cặp mỗi đặt khoảng nhiệt độ gắn mỗi từ

49°C đến 60°C. Kết quả cho thấy nhiệt độ gắn mỗi tốt nhất ở 58,1 °C, cho sản phẩm PCR rõ và nét nhất (Hình 1). Đối với thời gian duy trì nhiệt độ gắn mỗi phụ thuộc số lượng các nucleotid G và C (4°C/nucleotid) cũng như A và C (2°C/nucleotid) trên trình tự primer. Các môi ctxA và tcpA có độ dài 20 và 23bp được thử nghiệm với 4 mốc thời gian gắn mỗi là 30, 45, 60 và 90 giây. Kết quả chạy gradient thời gian gắn mỗi phù hợp đối với cả hai gen đích ctxA và tcpA cho sản phẩm PCR đạt quả tốt nhất là 45 giây (Hình 2). Kết quả này tương tự với của một số tác giả công bố gần đây như của Chomvarin C và CS (2007), Kapley và Purohit (2001), Shirai và CS (1991), tuy nhiên có một ít khác biệt như nhiệt độ gắn mỗi trong nghiên cứu này cao hơn của các tác giả khác từ 1-1,5 °C và thời gian bắt mỗi của chúng tôi tương đương hoặc dài hơn khoảng 15 giây (2,5,7) .

2. Độ nhạy và đặc hiệu phản ứng PCR đa môi khuếch đại gen đích ctxA và tcpA.

Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng các chủng *V. cholerae* O1 phân lập từ bệnh nhân, các chủng *Salmonella* và *E. Coli* đã được xác định bằng nuôi cấy và phân lập để đánh giá độ nhạy và đặc hiệu của phản ứng PCR đa môi. Thực hiện phản ứng PCR đa môi đồng thời với hai gen đích ctxA và tcpA của *V. cholerae* là các gen mã hóa độc tố tả (ctxA) và độc tố lông giúp vi khuẩn tả xâm nhập tế bào niêm mạc ruột (tcpA). Kết quả cho thấy độ nhạy đạt 100% và ngưỡng phát hiện đạt 36 fg DNA tương đương 10 tế bào vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy. Ngược lại, phản ứng PCR đa môi này đối với các chủng không phải *V. cholerae* là *Salmonella* và *E. Coli* cho kết quả 100% trường hợp âm tính và độ đặc hiệu của kỹ thuật là 100% (Hình 4, Bảng 3). Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu gần đây với độ đặc hiệu của kỹ thuật là 100% và ngưỡng phát hiện là 100fg DNA tương đương khoảng 23 vi khuẩn (2,5). Gần đây một số tác giả phát triển kỹ thuật PCR đa môi phát hiện các mầm bệnh (tả, *E. coli*...) trong các môi trường như ao, hồ, sông suối. Kỹ thuật PCR đa môi đã chứng minh ưu thế vượt trội so với nuôi cấy vì những hạn chế và khó khăn khi tăng sinh các chủng ở môi trường tự nhiên (2-7). Nhờ có độ nhạy, đặc hiệu cao và ngưỡng phát hiện thấp nên những phản ứng PCR đa môi này

có thể giúp các nhà lâm sàng, nghiên cứu có cơ sở phát hiện nhanh mầm bệnh trong mẫu bệnh phẩm góp phần cải thiện chẩn đoán.

KẾT LUẬN

Chu trình luân nhiệt thực hiện phản ứng PCR đa môi nhân đồng thời hai gen đích ctxA và tcpA xác định *V. cholerae* gây bệnh tả là: 1 chu kỳ ở 95°C x 3 phút; 35 chu kỳ (95°C x 30 giây, 58,1°C x 45 giây, 72°C x 30 giây), 1 chu kỳ ở 72°C x 7 phút và giữ ở 4 °C.

Kỹ thuật PCR đa môi với hai gen đích ctxA và tcpA xác định *V. cholerae* gây bệnh tả có độ nhạy và độ đặc hiệu 100%, ngưỡng phát hiện 36fg DNA mẫu tách từ môi trường nuôi cấy vi khuẩn tả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Linh Toàn, Nguyễn Thái Sơn, Hoàng Xuân Sửu và Bùi Tiến Sỹ (2009). Nghiên cứu xác định độ nhạy và đặc hiệu của kỹ thuật PCR chẩn đoán *Vibrio cholerae* gây bệnh tả. *Tạp chí y dược học Quân sự*. 34 (7), 10-15.
2. Chomvarin C, Wiset Namwat, Suwin Wongwajana, Muniral Alam, Kesorn Thaew-Nonngiew, Anuchit Sinchaturus, and Chulapan Engchanil (2007). Application of duplex-PCR in rapid and reliable detection of toxigenic *Vibrio cholerae* in water samples in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 53, 229–237.
3. Faruque SM, Sack DA, Sack RB, Colwell RR, Takeda Y, Nair GB (2003). Emergence and evolution of *Vibrio cholerae* O139. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4;100(3):1304-9.
4. Huq A, Colwell RR, Chowdhury MA, Xu B, Moniruzzaman SM, Islam MS, Yunus M, Albert MJ (1995). Coexistence of *Vibrio cholerae* O1 and O139 Bengal in plankton in Bangladesh. *Lancet*. 345(8959):1249.
5. Kapley, A. and Purohit, H. J. (2001). Detection of etiological agent for cholera by PCR protocol. *Med Sci Monit.*, 7,242–245.
6. Shears P (2001). Recent developments in cholera. *Curr Opin Infect Dis*. 14(5):553-8.
7. Shirai, H., Nishibuchi, M., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Pal, S. C., and Takeda, Y. (1991). Polymerase chain reaction for detection of the cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 2517–2521.