

PHÁT TRIỂN PHẢN ỨNG PCR ĐA MÔI PHÁT HIỆN CÁC NHÓM *SALMONELLA* TYPHI, *S. PARATYPHI A* VÀ *S. PARATYPHI B*

NGUYỄN LĨNH TOÀN và cộng sự
Học viện Quân y

TÓM TẮT.

Phản ứng PCR đã được ứng dụng rộng rãi trong phát hiện tác nhân gây bệnh trong các mẫu bệnh phẩm sinh học. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã chuẩn hóa điều kiện phản ứng PCR đa môi (mPCR) phát hiện trình tự trong bộ gen của các nhóm *Salmonella* serovars Typhi, Paratyphi A and B. Kết quả cho thấy điều kiện luân nhiệt chuẩn có hiệu quả thực hiện phản ứng mPCR là 35 chu kỳ (94°C x 30 giây, 57°C x 45 giây, 72°C x 45 giây). Ngưỡng phản ứng mPCR ở giới hạn cho phép là $1,2 \times 10^{-6}$ ng DNA mẫu chuẩn.

Từ khóa: PCR đa môi, mPCR, *Salmonella*.

Development of a multiplex PCR assay for detection of groups of *Salmonella* typhi, *S. paratyphi A* and *S. paratyphi B*

SUMMARY

PCR amplification has been widely applied for the detection of pathogens in biological material. In this study, we optimised a multiplex PCR (mPCR) assay to detect specific target sequences in the genomes of *Salmonella* Typhi, Paratyphi A and B. The result shows that mPCR assay was cycled under the following optimised conditions at 35 cycles of 30 sec at 95°C, 45 sec at 57°C and 45 sec at 72°C. The limited DNA template for positive mPCR assay was $1,2 \times 10^{-6}$ ng DNA.

Key words: multiplex PCR, mPCR, *Salmonella*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Salmonella lần đầu tiên được phân lập ở Mỹ vào năm 1885 bởi Salmon và tên gọi của nó được bắt nguồn từ đó. *Salmonella* là vi khuẩn đường ruột *enterobacteriaceae* có hơn 2400 kiểu huyết thanh. Đây là trực khuẩn Gram âm, thường bắt màu ở hai đầu, kích thước khoảng 0,6 - 2,0 µm, di động nhờ nhiều lông xung quanh thân (trừ *S. gallinarum* và *S. pullorum*). *Salmonella* có khoảng 2500 kiểu kháng nguyên, các kiểu kháng nguyên được chia dựa trên 3 loại kháng nguyên chính là O, H, Vi (1-3). Cơ chế gây bệnh của *Salmonella* qua đường tiêu hóa, trực khuẩn xâm nhập vào cơ thể qua đường miệng. Sau khi xuyên qua hàng rào acid dạ dày, vi khuẩn di động về phía ruột non và sinh sản ở đó, tiếp tục chui qua màng nhày và vào thành ruột. Các tế bào Paneth của niêm mạc ruột tiết ra một loại peptide có tính chống lại sự xâm nhập của tác nhân gây bệnh. Sự xâm nhiễm *Salmonella* vào cơ thể vật chủ và gây bệnh với biểu hiện phổ biến nhất là gây tiêu chảy, đôi khi gây bệnh là thương hàn và phó thương hàn. Để gây bệnh, *Salmonella* cần phải xâm nhiễm thành công vào bên trong thành ruột, thích nghi và vô hiệu hoá hệ thống phòng vệ của vật chủ, sau đó nhân lên và phát tán đến các mô đích. *Salmonella* được gọi tên theo kiểu huyết thanh: *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. Typhimurium*... Các kiểu huyết thanh gây bệnh chủ yếu nằm trong *S. enterica* I (4-6).

Hiện nay, có nhiều phương pháp chẩn đoán *Salmonella* như phương pháp nuôi cấy phân lập, miễn dịch học, sinh học phân tử như PCR đơn môi, PCR đa môi, real time PCR... Với độ nhạy và độ đặc hiệu cao phương pháp sinh học phân tử rất có giá trị trong chẩn đoán chính xác mầm bệnh trong các mẫu bệnh phẩm (2-8). Trong nghiên cứu này chúng tôi tối ưu hóa điều kiện phản ứng PCR đa môi chẩn đoán một số kiểu huyết thanh của *Salmonella* gây bệnh ở người.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu và đối tượng nghiên cứu.

-**Vi khuẩn *Salmonella*.** Các chủng *Salmonella* gây bệnh thường hàn gồm *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* và *Salmonella paratyphi B* được tăng sinh qua đêm trên môi trường chuyên biệt làm panel mẫu chuẩn để xác định điều kiện chuẩn của phản ứng mPCR.

-**Kít tách và tinh sạch DNA:** dùng bộ kít tách DNA của hãng QIAgen

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Tăng sinh và nuôi cấy vi khuẩn. Các chủng *Salmonella* được nuôi cấy và tăng sinh trên môi trường chuyên biệt, tách tinh sạch DNA làm panel mẫu chuẩn.

2.2. Tách và tinh sạch ADN vi khuẩn. Mỗi trường sau tăng sinh được tách DNA dùng bộ kít của hãng QIAgen. Qui trình tách tinh sạch theo hướng dẫn của nhà sản xuất (www1.qiagen.com). Nồng độ DNA và bảo quản ở -20 °C đến khi sử dụng.

2.3. Các primer xác định các *Salmonella* gây bệnh.

Bảng 1. Trình tự primer của phản ứng mPCR phát hiện các nhóm *Salmonella* (2)

Tên môi	Trình tự (5' - 3')	Kích thước (bp)	Nhóm Sal.
H-for	ACTCAGGCTTCCGTAACGC		
Ha-rev	GAGGCCAGCACCATCAAGTGC	423	Sal. T
Hb-rev	GCTTCATACAGACCATCTTAGTTG	551	Sal. para.A
Hd-rev	GGCTAGTATTGCTTATCGG	763 (d) or 502 (j)	Sal. para.B

2.4. Thành phần phản ứng mPCR xác định các *Salmonella* gây bệnh.

Bảng 2. Thành phần phản ứng mPCR phát hiện 3 nhóm *Salmonella* gây bệnh

TT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μl)
1.	Nước khử ion		16,35
2.	Đệm gồm MgCl ₂ (10X)	MgCl ₂ : 1,5 mM	2,5
3.	dNTPs	2,5 mM	2,0
4.	Mỗi H-for, Ha-rev, Hb-rev, Hd-rev,	10pmol/ mỗi môi	2,0
5.	Taq DNA polymerase (NEB)	0,75UI	0,15
DNA tổng số			3
Tổng số (μl)			25

3.5. Phương pháp tối ưu hoá các điều kiện tối ưu của phản ứng mPCR.

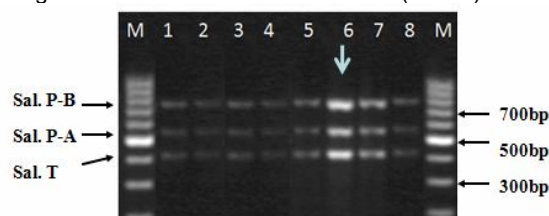
Tiến hành nội dung nghiên cứu này, phản ứng PCR được cố định các điều kiện khác chỉ cho một điều kiện thăm dò thay đổi. Sử dụng hệ thống PCR có chương trình gradient để thực hiện phản ứng mPCR với các cặp môi đặc hiệu theo qui trình trên sau đó dựa vào kết quả

để đánh giá điều kiện tối ưu của phản ứng mPCR.

KẾT QUẢ

1. Tối ưu hóa nhiệt độ gắn môi phản ứng PCR đa môi phát hiện các nhóm *Salmonella*

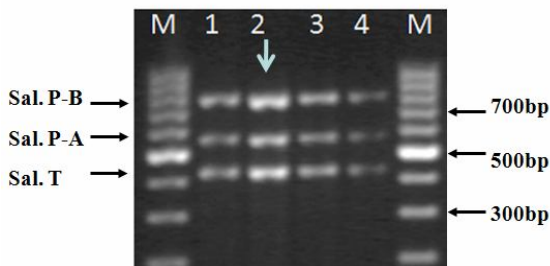
Tối ưu hóa nhiệt độ gắn môi phản ứng mPCR đối với là *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* gây bệnh ở người, chúng tôi thực hiện gradient nhiệt trên máy iCycler với giải nhiệt độ từ 49 °C đến 60 °C tương ứng các điểm đặt nhiệt là: 49; 5,4; 52,8; 54,3; 55,7; 57,2; 58,6 và 60 °C. DNA mẫu được tách từ các chủng chuẩn *Sal. typhi*, *Sal. P-A* và *Sal. P-B* sau khi tăng sinh nuôi cấy. Kết quả cho thấy trên ảnh điện di sản phẩm PCR rõ nét nhất ở cột số 6 tương ứng nhiệt độ gắn môi 57,2 °C phát hiện đồng thời các nhóm *Salmonella* nêu trên (Hình 1).



Hình 1. Sản phẩm mPCR phát hiện *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A* và *S. paratyphi B* tìm nhiệt độ gắn môi. M: thang chuẩn DNA, 100bp; cột 1-8: nhiệt độ gắn môi tương ứng 49; 5,4; 52,8; 54,3; 55,7; 57,2; 58,6 và 60 °C. Trên ảnh điện di sản phẩm PCR rõ nét nhất ở cột số 6 tương ứng nhiệt độ gắn môi 57,2 °C.

2. Tối ưu hóa thời gian gắn primers phản ứng PCR đa môi phát hiện các nhóm *Salmonella*

Tối ưu hóa thời gian gắn primer của phản ứng mPCR đối với các gen đích của *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* gây bệnh ở người. Phản ứng mPCR được thực hiện gradient nhiệt trên máy iCycler với giải thời gian gắn môi từ 30s, 45s, 60s và 90s trên các DNA mẫu chuẩn được tách từ các chủng chuẩn *Sal. typhi*, *Sal. P-A* và *Sal. P-B* sau khi tăng sinh nuôi cấy. Kết quả cho thấy sản phẩm mPCR rõ nét nhất với thời gian gắn môi 45 giây (Hình 2, cột 2).

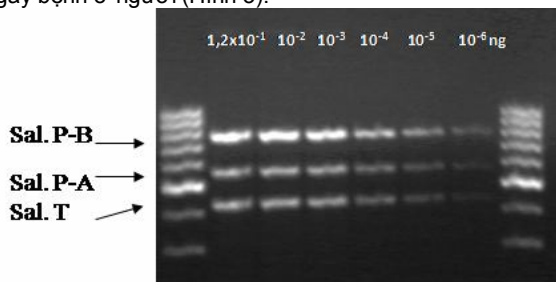


Hình 2. Sản phẩm mPCR phát hiện *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A* và *S. paratyphi B* tìm thời gian gắn môi. M: thang chuẩn DNA 100bp; cột 1-4, tương ứng thời gian gắn môi 30, 45, 60 và 90 giây, thí nghiệm cho thấy sản phẩm mPCR rõ nét nhất ở thời gian gắn môi 45 giây (cột 2).

Như vậy, chu trình luân nhiệt có hiệu quả để thực hiện mPCR phát hiện đồng thời *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* là 01 chu kỳ 94 °C x 5 phút, 35 chu kỳ (94 °C x 30 giây, 57 °C x 45 giây, 72 °C x 45 giây) và 72 °C x 7 phút.

3. Ngưỡng phát hiện của phản ứng mPCR phát hiện *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* gây bệnh ở người.

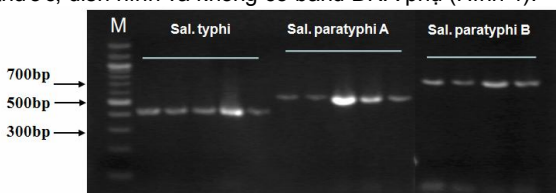
Để thực hiện phản ứng mPCR tìm giới hạn tối thiểu phản ứng PCR có thể phát hiện được các chủng *Salmonella*, chúng tôi hòa loãng nồng độ DNA mẫu chuẩn giảm dần. Kết quả ở nồng độ $1,2 \times 10^{-6}$ ng DNA phản ứng mPCR còn dương tính với đồng thời cả các chủng *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A* và *S. paratyphi B* gây bệnh ở người (Hình 3).



Hình 3. Ngưỡng phát hiện với nồng độ tối thiểu DNA *Salmonella* của phản ứng mPCR. Cột 1: thang chuẩn DNA, cột 2: chứng âm, cột 3-9: tương ứng với các nồng độ $1,2 \times 10^{-1}$, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , $1,2 \times 10^{-6}$ ng DNA.

4. Kết quả thực hiện phản ứng mPCR trên các panel mẫu chuẩn các *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* gây bệnh ở người.

Đánh giá khả năng phát hiện của phản ứng mPCR chúng tôi thực hiện trên các panel mẫu chuẩn các *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*. Mỗi chủng thực hiện 4-5 mẫu song song, kết quả cho thấy 100% các mẫu đều cho sản phẩm PCR đúng kích thước, điển hình và không có band DNA phụ (Hình 4).



Hình 4. Sản phẩm mPCR phát hiện *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A* và *S. paratyphi B* trên các panel mẫu chuẩn. M: thang chuẩn DNA 100bp.

BÀN LUẬN

-Nhiệt độ gắn mồi. Trong phản ứng mPCR nhiệt độ gắn mồi là một thông số đặc biệt quan trọng. Nhiệt độ gắn mồi phụ thuộc vào kích thước của mồi, nhiệt độ nóng chảy của mồi (T_m), những mồi ngắn (18-24bp) và phần trăm GC chiếm 35-60% nhiệt độ gắn mồi vào khoảng 55-58°C hoặc cao hơn. Những mồi dài (28-30bp) cho phép phản ứng thực hiện ở nhiệt độ gắn mồi cao hơn và ít có sản phẩm phụ hơn. Phản ứng mPCR (PCR đa mồi) là một dạng của PCR thông thường, trong đó dùng từ hai cặp mồi trở lên nhân các đoạn gen hoặc một đoạn gen của các kiểu gen khác nhau, hoặc các mầm bệnh khác nhau trong cùng một phản ứng PCR. Đối với phản ứng PCR đa mồi, yếu tố quan trọng là các mồi. Các bộ mồi cần được thiết kế tránh không bắt cặp với nhau do có trình tự bổ sung, khoảng nhiệt độ

Tm chênh nhau không nhiều hoặc tương đương về tỷ lệ GC. Sau đó là điều kiện của phản ứng PCR đóng vai trò quan trọng đó là nhiệt độ gắn mồi, thời gian gắn mồi, nồng độ $MgCl_2$... mặc dù nguyên lý PCR khá đơn giản, nhưng không có công thức chung cho một phản ứng PCR đa mồi cụ thể nào. Vì vậy, khi thực hiện phản ứng PCR đa mồi chúng ta phải tự nghiên cứu thăm dò, tìm kiếm qui trình phù hợp khi áp dụng cụ thể. Hay nói cách khác qui trình thực hiện phản ứng PCR đa mồi xác định nhiều đoạn gen hoặc nhiều mầm bệnh nào đó cần phải chuẩn hóa điều kiện phản ứng và cụ thể hóa từng bước mới thực hiện thành công cho hiệu quả phát hiện cao.

Thực hiện tối ưu hóa điều kiện phản ứng mPCR phát hiện các nhóm *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A* và *S. paratyphi B* gây bệnh ở người. Trước tiên chúng tôi tìm nhiệt độ và thời gian gắn mồi phù hợp cho phản ứng PCR đa mồi đối với các gen đích của các nhóm *Salmonella* này. Kỹ thuật này được thực hiện sử dụng chương trình gradient nhiệt trên máy iCycler. Kết quả cho thấy nhiệt độ gắn mồi tốt nhất cho sản phẩm PCR rõ nét của bộ kit mPCR phát hiện các nhóm *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A* và *S. paratyphi B* là 57°C. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi so với một số tác giả công bố gần đây khi nghiên cứu phát hiện các nhóm và giai đoạn 2 nhiệt độ này tăng lên 60°C (2-5).

-Thời gian duy trì nhiệt độ gắn mồi. Theo quy trình chuẩn của phản ứng PCR các mồi có độ dài từ 18-30bp thường cần thời gian duy trì gắn mồi từ 30 giây đến 90 giây. Các mồi nghiên cứu của chúng tôi kích thước từ 20 đến 25bp, nên khi tối ưu thử với các khoảng thời gian duy trì lần lượt là 30giây – 45giây – 60giây – 90giây. Tại khoảng thời gian 45 giây đồng thời cả 3/3 mẫu chuẩn cho sản phẩm PCR đặc hiệu và rõ nét hơn so với các thời gian khác. Vì vậy chúng tôi lựa chọn thời gian 45 giây là phù hợp và áp dụng cho các lần chạy sau.

-Ngưỡng phát hiện của phản ứng mPCR trên panel mẫu chuẩn *Salmonella*. Phản ứng PCR đã được nhiều tác giả chứng minh là có độ nhạy và đặc hiệu rất cao khi phát hiện các nhóm *Salmonella* gây bệnh. Nghiên cứu của Nga và Cs, (2010) khả năng phát hiện *Salmonella paratyphi A* từ 39-60 copies/ml máu, *Salmonella typhi* là 600 copies/ml. Bằng định lượng vi khuẩn trong máu, Wain và CS., (1998) chứng minh 25% bệnh nhân thương hàn có ít hơn 0,1 cfu/ml và chỉ 1% xét nghiệm được số cfu/ml lớn hơn 100 vi khuẩn trong máu. Trong nghiên cứu này cho thấy mPCR phát hiện $1,2 \times 10^{-6}$ ng DNA *Salmonella* mẫu chuẩn (8).

KẾT LUẬN

Phản ứng mPCR với các cặp mồi đặc hiệu cho phép chẩn đoán phân biệt các nhóm *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A* và *S. paratyphi B* gây bệnh. Chu trình luân nhiệt có hiệu quả thực hiện mPCR là 35 chu kỳ (94°C x 30 giây, 57°C x 45 giây, 72°C x 45 giây), ngưỡng phát hiện cho phép là $1,2 \times 10^{-6}$ ng DNA

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ali K, Zeynab A, Zahra S, Akbar K, Saeid M. Development of an ultra rapid and simple multiplex polymerase chain reaction technique for detection of *Salmonella typhi*. *Saudi Med J*. 2006;27(8):1134-1138.
2. Levy H, Diallo S, Tennant SM, Livio S, Sow SO, Tapia M, Fields PI, Mikoleit M, Tamboura B, Kotloff KL, Lagos R, Nataro JP, Galen JE, Levine MM. PCR method to identify *Salmonella enterica* serovars Typhi, Paratyphi A,

and Paratyphi B among Salmonella Isolates from the blood of patients with clinical enteric fever. *J Clin Microbiol.* 2008 May;46(5):1861-6. Epub 2008 Mar 26

3. Lim BK, Thong KL. Application of PCR-based serogrouping of selected Salmonella serotypes in Malaysia. *J Infect Dev Ctries.* 2009 Jul 1;3(6):420-8.

4. Lim, Y. H., K. Hirose, H. Izumiya, E. Arakawa, H. Takahashi, J. Terajima, K. Itoh, K. Tamura, S. I. Kim, and H. Watanabe. 2003. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56:151–155.

5. Lin, C. L., C. H. Chiu, C. Chu, Y. C. Huang, T. Y. Lin, and J. T. Ou. 2007. A multiplex polymerase chain reaction method for rapid identification of *Citrobacter freundii* and *Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 40:222–226

6. Massi MN, Shirakawa T, Gotoh A, Bishnu A, Hatta M, Kawabata M. Rapid diagnosis of typhoid fever by PCR assay using one pair of primers from flagellin gene of *Salmonella typhi*. *J Infect Chemother.* 2003;9(3):233–237. doi: 10.1007/s10156-003-0256-4.

7. Nga TV, Karkey A, Dongol S, Thuy HN, Dunstan S, Holt K, Tu le TP, Campbell JI, Chau TT, Chau NV, Arjyal A, Koirala S, Basnyat B, Dolecek C, Farrar J, Baker S. The sensitivity of real-time PCR amplification targeting invasive *Salmonella* serovars in biological specimens. *BMC Infect Dis.* 2010 May 21;10:125.

8. Wain J, Diep TS, Ho VA, Walsh AM, Nguyen TT, Parry CM, White NJ. Quantitation of bacteria in blood of typhoid fever patients and relationship between counts and clinical features, transmissibility, and antibiotic resistance. *J Clin Microbiol.* 1998;36(6):1683–1687