

gel (BBL), Ethidium bromide dùng nhuộm gel, TAE (Tris Acetate EDTA).

- Máy iu nhit t ng GienAmp PCR System 9700 AB (Applied Biosystem, M), máy ly tâm lnh (Beckman), b i n di ngang Horizon®58 (Gibco-BRL c a M), máy soi và ch p gel Geldoc (BioRad M).

3. Ph ng pháp nghiên c u

3.1. nh y c a PCR a m i xác nh Salmonella tr cti pt phân.

Qui trình tách chi t ADN tr cti pt phân

Qui trình đ a trên nghiên c u c a Trung và c ng s [1, 2]. Tóm t t qui trình nh sau:

- B c 1: 200 mg phân c hoà th t u v i 1ml huy n dch vi khu n có c Macfarland 4 (10^9 vi khu n/ml) và 2 ml n c c t, l c u trên máy l c.

- B c 2: Ly tâm huy n dch phân b c 1 v i t c 1000 vòng/phút trong 10 phút cho l ng các thành ph n có kích th c l n. L y n c n i.

- B c 3: N c n i t b c 2 c ly tâm t i p v i t c 2000 vòng/phút trong 10 phút l ng các thành ph n có kích c trung bình. L y n c n i.

- B c 4: N c n i t b c 3 c ly tâm t i p v i t c 4000 vòng/phút trong 10 phút l ng vi khu n. Lo i b n c n i và l y c n.

- B c 5: Hoà tan c n v i 500 l n c c t, tr n u trên máy l c. Ly tâm v i t c 4000 vòng/phút trong 5 phút.

L p l i quá trình r a c n này 1-2 l n n khi n c n i không còn màu vàng c a phân. Lo i b n c n i

- B c 6: Hoà tan c n thu c b c 5 vào 300 l n c c t. un sôi cách thu 100°C trong 20 phút.

Sau khi un làm l nh ngay b ng cách cho ng Eppendorf vào khay ng á v n.

- B c 7: Ly tâm l nh 12000 vòng/phút trong 15 phút, lo i b c n.

N c n i ch a ADN dùng làm khuôn m u cho ph n ng PCR. N u ch a dùng ngay, n c n i c b o qu n -20°C .

Xác nh nh y c a h th ng PCR a m i

- Pha ch ng *Salmonella typhi* vào 1 ml n c c t có c Macfarland 4.

- Pha loãng 10 l n các huy n dch ch a 10^9 vi khu n/ml này có các n ng t 10^9 , 10^8 n 10^1 , 10^0 vi khu n/ml.

- Tr n 1 ml t ng huy n dch vi khu n trên v i 200 mg phân ã c xác nh không có *Salmonella* gây tiêu ch y b ng nuôi c y phân l p và PCR.

- Tách chi t ADN theo qui trình 3.1.

- T i n hành k thu t PCR a m i v i ADN thu c sau khi tách chi t.

Các thành ph n tham gia ph n ng PCR nh sau:

M i ph n ng g m 25 μl các thành ph n sau: 12,5 μl PCR master mix (Epicentre, Canada); 2,5 mM c p m i OMPCF-OMPCR và ctxB2-ctxB3 (Promega, M), 3 μl ADN m u. Chu trình nh t nh sau $95^{\circ}\text{C}/2'$; 30 chu k : $95^{\circ}\text{C}/1'$, $57^{\circ}\text{C}/1'$, $72^{\circ}\text{C}/2'$; m t chu k $72^{\circ}\text{C}/7'$, gi 4°C .

- nh y c a ph n ng PCR a m i (gi i h n phát hi n) c xác nh là n ng vi khu n th p nh t cho k t qu PCR Đ ng tính. So sánh v i ph ng pháp tách chi t b ng b kit QIAamp DNA Stool Mini Kit c a hãng QIAGEN (c).

3.2. c h i u c a PCR a m i

- Pha l n l t các ch ng *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp*, ch ng *E. coli* ATCC 11775, 5 ch ng *E. coli* gây tiêu ch y vào 1 ml n c c t có c Macfarland 4 (t ng ng v i 10^9 vi khu n/ml).

- Các huy n dch ch a 10^9 vi khu n/ml c pha loãng 10 l n có các n ng t 10^9 , 10^8 n 10^1 , 10^0 vi khu n/ml.

- Tr n 1 ml t ng huy n dch vi khu n trên v i 200 mg phân ã c xác nh không có *Salmonella*.

- Tách chi t ADN theo qui trình 3.1.

- T i n hành k thu t PCR a m i v i ADN thu c sau khi tách chi t.

- c h i u c xác nh là t l các ch ng Âm tính v i PCR a m i trên t ng s các ch ng c th . So sánh v i ph ng pháp tách chi t b ng b kit QIAamp DNA Stool Mini Kit c a hãng QIAGEN (c).

3.3. ánh giá ch t l ng s n ph m PCR

B ng 1. Tiêu chu n ánh giá ch t l ng s n ph m PCR

Tính ch t b ng ADN trên th ch i n di	ánh giá k t qu
Không có b ng ADN	(-)
B ng ADN m ho c ch m h t thành hàng	(+)
B ng ADN nh ho c v a, nhìn rõ	(++)
B ng ADN l n, m nhìn r t rõ	(+++)

4. X lý s li u

Các s li u c qu n lý và phân tích b ng ch ng trình SPSS 12.0

5. Th i gian nghiên c u

T tháng 1 n m 2007 n tháng 8 n m 2008.

6. a i m nghiên c u

- B môn Vi sinh- Tr ng i h c Y Hà N i.

- Khoa Xét nghi m Vi n các b nh Truy n nhi m và Nhi t i Qu c gia.

K T QU NGHIÊN C U

1. Xác nh nh y c a PCR a m i

B ng 2. K t qu nh y c a h th ng PCR a m i

N ng vi khu n/ml	S th t các l n th									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10 ⁹	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10 ⁸	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10 ⁷	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10 ⁶	+++	+++	++	+++	+++	++	++	++	++	++
10 ⁵	++	++	-	++	++	+	-	-	-	-
10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

K t qu B ng trên cho th y, nhìn chung, PCR cho k t qu D ng tính n ng 10⁶ CFU/ml.

l p l i là 100% qua 10 l n th .

M t s l n th cho k t qu D ng tính n ng 10⁵ CFU/ml. Ti n hành th v i 5 ch ng S. typhi phân l p t b nh nhân cho k t qu t ng t . N u s d ng b kit QIAamp, ng ng phát hi n là 10⁷ VK/ml cho các l n th .

2. Xác nh c hi u c a PCR a m i

c hi u c xác nh là t l các ch ng Âm tính v i PCR a m i trên t ng s các ch ng c th .

B ng 3. c hi u c a PCR a m i

Tên ch ng	S l n th c hi n	K t qu PCR		c hi u (%)
		(+)	(-)	
Citrobacter freundii	10	0	10	100%
Proteus vulgaris	10	0	10	100%
Klebsiella pneumoniae	10	0	10	100%
Enterobacter spp	10	0	10	100%
E. coli 11775	10	0	10	100%
5 ch ng E. coli không gây tiêu ch y	50	0	50	100%

Nh n xét K t qu b ng 3 cho th y, PCR a m i v i các vi khu n ng ru t khác u âm tính. i u ó ch ng t c hi u c a h th ng PCR a m i b ng 100%.

BÀN LU N

1. nh y c a PCR a m i

H i n nay, PCR c ánh giá là m t k thu t có nh y và c hi u r t cao, g n 100%. K thu t có c nh y và c hi u cao là do PCR s d ng c p m i g n c hi u vào o n ADN ích.

Tuy nhiên, khi th c hi n k thu t PCR, ng i ta th y r ng nh y c a ph n ng này c ng chính là gi i h n phát hi n c a ph n ng. Gi i h n này chính là n ng c a o n ADN ích trong h n h p ph n ng. M t quá trình tách chi t ADN t t s cho m t

dung d ch ADN có ch t l ng cao và n ng ph n ng PCR cho k t qu d ng tính.

Theo k t qu c a B ng 2, gi i h n phát hi n c a PCR a m i xác nh *Salmonella* tr c ti p t phân là 10⁶ CFU/ml. Trong khi ó, nh y c a ph n ng PCR v i ADN tách chi t tr c ti p t phân b ng b kit th ng ph m QIAamp là 10⁷ CFU/ml. K t qu i n di trên gel o n ADN c khuy ch i có kích th c phù h p (so v i marker) và không có s xu t hi n c a các b ng không c hi u. Ngoài ra, khi ti n hành l p l i 10 l n, th nghi m u cho k t qu t ng t .

Nh v y, ngoài nh ng u i m n gi n, không c n các máy móc và trang thi t b t ti n, d th c hi n, kinh t h n, m t ít th i gian h n h th ng PCR a m i xác nh *Salmonella* s d ng ADN tách tr c ti p t phân b ng qui trình c a chúng tôi, có nh y cao h n so v i PCR a m i s d ng ADN tách tr c ti p t phân b ng b kit QIAamp. M c dù có m t s nghiên c u s d ng k thu t PCR phát hi n tr c ti p *Salmonella* t phân [3, 7, 8]. Trong nghiên c u c a Pathmanathan [8] s d ng PCR v i c p m i c hi u cho gen *hlyA* c a S. typhimurium, cho nh y là 10⁵ CFU/ml khi tách tri t tr c ti p t phân. Tuy nhiên, trong nghiên c u này, tác gi không c p n l p l i c a th c nghi m. Trong nghiên c u c a chúng tôi, l p l i c a th c nghi m là 100% (10/10) l n u có k t qu nh y là 10⁶ CFU/ml và 50% (5/5) l n cho nh y là 10⁵ CFU/ml. Ngoài ra, qui trình c a chúng tôi ch m t kho ng 6 h k c th i gian ch y PCR, i n di so v i 18 h nh trong nghiên c u c a Pathmanathan.

2. Xác nh c hi u c a h th ng PCR a m i

ánh giá c hi u c a h th ng PCR a m i chúng tôi ti n hành v i m t s ch ng vi khu n thu c h vi khu n ng ru t. Các ch ng này bao g m : *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp, ch ng E. coli ATCC 11775 và 5 ch ng E. coli gây tiêu ch y thu c các lo i (EAEC, EHEC, EIEC, EPEC, và ETEC). K t qu nghiên c u cho th y, v i t t c các ch ng vi khu n c th nghi m, PCR u cho k t qu âm tính. PCR a m i xác nh *Salmonella* tr c ti p t phân, hoàn

toàn c hi u v i các *Salmonella*. Không có hi n t ng âm tính gi v i các vi khu n khác trong ng tiêu hóa.

Th c ch t, c hi u c a ph n ng PCR chính là c hi u c a các c p m i s d ng. C p m i ph i c l a ch n sao cho có kh n ng ghép c p t t v i trình t 2 u c a o n ADN ích. K t qu xác nh c hi u ghi nh n c còn cho th y, o n ADN ích c l a ch n khu y ch i, có trình t các nucleotid trong o n gien t ng i n nh và xu t hi n v i t n s cao các ch ng *Salmonella*; nh ng l i không th y trên ADN c a các ch ng vi khu n ng ru t khác.

M t nghiên c u tr c ây ã s d ng c p m i OMPCF và OMPCR xác nh các *Salmonella* [3]. K t qu nghiên c u cho th y, khi th v i các ch ng *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella boydii*, PCR cho k t qu Âm tính. Tuy nhiên, k t qu c a nghiên c u c th c hi n v i ADN tách chi t t các ch ng vi khu n thu n. Trong nghiên c u này, chúng tôi c ng s d ng c p m i nêu trên, nh ng l i th c hi n v i ADN c tách chi t t r c ti p t phân. i u ó có ngh a là dung d ch ADN tách chi t c, không ch có ch a ADN c a các ch ng vi khu n mà chúng tôi tr n vào, mà còn có ADN t nhi u lo i vi khu n khác nhau có trong m u phân. Trong nghiên c u, tuy chúng tôi tr n nh ng ch ng vi khu n ng ru t hay gây b nh cho ng i vào phân, nh ng dung d ch sau khi tách chi t s v a có ADN c a chúng v a bao g m ADN c a t t c các ch ng vi khu n khác có m t trong m u phân. Do v y, khi th c hi n xác nh c hi u c a PCR trên dung d ch sau tách chi t này, vô hình dung chúng tôi c ng ã ti n hành th nghi m c hi u c a PCR v i t t c các ch ng vi khu n khác có m t trong m u phân. Hay có th nói th nghi m c a chúng tôi ã rút ng n c r t nhi u th i gian và t i t ki m c nhi u v t li u và công s c.

K T LU N

- **nh y c a h th ng PCR a m i** xác nh *Salmonella* là 10^6 CFU/ml, l p l i c a th nghi m là 100%.

- **c hi u c a h th ng PCR a m i** xác nh *Salmonella* tr c ti p t phân là 100%.

SUMMARY

Multiplex PCR using 2 primer pairs specific to *Salmonella* and *V. cholerae* was able to detect *Salmonella* isolates with advantages such as less time, simple manner and cost-effectiveness as compared to the commercial kit. The sensitivity was 10^6 CFU/ml with the reproduction of 100%. The specificity was almost 100%. The results can be applied in clinical laboratories for early detection of *Salmonella* and it would give good outcome for diagnosis and treatment for patients with diarrhea.

Keywords: *Salmonella*, PCR, diarrhea.

TÀI LI U THAM KH O

1. Nguy n V Trung , Nguy n Th Tuy t Trinh, 2008. *Ph t tri n và hoàn thi n qui tr nh t ch chi t ADN x c nh tr c ti p Escherichia coli gây tiêu ch y b ng PCR*. Nghi n c u y h c. 56(4): p. 92-97.
2. Nguy n V Trung, Nguy n Th H ng Nhung, 2008. *Hoàn thi n k thu t t ch chi t ADN c a Shigella và EIEC tr c ti p t phõn*. Nghi n c u y h c. 55(3): p. 104-109.
3. Alvarez, J., et al., 2004. *Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of salmonella in human clinical samples*. J Clin Microbiol. 42(4): p. 1734-8.
4. Cabrera, R., et al., 2006. *Class 1 Integrons in Salmonella Strains causing traveler's diarrhea*. Antimicrob Agents Chemother. 50(4): p. 1612-3.
5. Cellai Rustici, M., et al., 2006. *Antibiotic resistance among Salmonella enterica isolates in Southern European children hospitalized for acute diarrhea*. Eur J Pediatr. 165(8): p. 577-8.
6. Chow, K.H., et al., 2001. *Detection of RTX toxin gene in Vibrio cholerae by PCR*. J Clin Microbiol. 39(7): p. 2594-7.
7. Kwang, J., E.T. Littledike, and J.E. Keen, 1996. *Use of the polymerase chain reaction for Salmonella detection*. Lett Appl Microbiol. 22(1): p. 46-51.
8. Pathmanathan, S.G., et al., 2003. *Simple and rapid detection of Salmonella strains by direct PCR amplification of the hilA gene*. J Med Microbiol. 52(Pt 9): p. 773-6.