

Thiết lập quy trình phản ứng Sandwich -ELISA phát hiện *E.coli* O157:H7 trong thịt bò

Phạm Công Hoat¹, Lê Văn Nhung²

Tóm tắt:

Với một kháng thể đa dòng chế qua thỏ và hai kháng thể đơn dòng Mab A10.16.I, Mab C3.26.IV đặc hiệu với kháng nguyên lòng đã thiết lập được phản ứng Sandwich-ELISA với các thông số: kháng thể đa dòng phủ đĩa: 12,5 µg/ml, kháng thể đơn dòng A10.16.I và C3.26.IV: 1,25 µg/ml, tác nhân block đĩa: sữa tách bơ 5%, conjugate: pha loãng 1/1000. Khả năng phát hiện *E.coli* O157:H7 trong thịt bò của phản ứng Sandwich-ELISA là tương đương với phương pháp PCR-multiplex.

Từ khoá: *E.coli* O157:H7, Phản ứng Sandwich –ELISA, Thịt bò

Development a Sandwich-ELISA to apply for detecting *E. coli* O157:H7 in beef

Pham Cong Hoat, Le Van Nhung

Summary:

A rabbit anti-*Escherichia coli* O157: H7 polyclonal antibody and two monoclonal antibodies A10.16.I Mab, Mab C3.26.IV specific for the H7 antigen have been used to develop a Sandwich-ELISA with the parameters: polyclonal antibody concentration 12.5µg/ml, monoclonal antibodies C3.26.IV and A10.16.I: 1.25µg/ml, block agent 5% skim milk, conjugate dilution 1/1000. The ability to detect *E.coli* O157: H7 in beef by sandwich-ELISA is equivalent to multiplex PCR

Keywords: *E.coli* O157:H7, Sandwich –ELISA, Beef

I. Đặt vấn đề

E.coli O157:H7 là vi khuẩn gây bệnh cho con người nhưng có nguồn gốc từ gia súc và các sản phẩm thực phẩm, vì vậy, phải có các hệ thống chẩn đoán, xác định vi khuẩn riêng cho người và động vật [3,4]. Về nguyên tắc chung, việc chẩn đoán, xác định vi khuẩn thường dựa trên 3 yếu tố: i) vi khuẩn trong mẫu bệnh phẩm hoặc thực phẩm; ii) kháng thể kháng O157 hoặc H7; iii) độc tố hoặc các gen độc tố.

Trong bài báo này, chúng tôi thiết lập phản ứng Sandwich –ELISA để phát hiện kháng nguyên lòng của *E.coli* O157:H7 dựa trên kháng thể đa dòng chế qua thỏ và 02 kháng thể đơn dòng A10.16.I Mab, Mab C3.26.IV đặc hiệu với kháng nguyên H7

II. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên liệu:

- Kháng thể đa dòng (nguồn gốc là kháng thể đơn dòng) chế qua thỏ (Pab) có hàm lượng 16mg/ml.
- Hai kháng thể đơn dòng ký hiệu A10.16.I và Mab C3.26.IV có hàm lượng tương ứng là 12mg/ml và 11,8mg/ml.
- Mẫu thịt bò bán ở các chợ khu vực Hà Nội

2.2 Phương pháp nghiên cứu

¹ Bộ Khoa học và Công nghệ

² Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

2.2.1 Phương pháp thu thập mẫu

Mẫu thịt bò được thu thập vào buổi sáng, tại một số chợ địa bàn Hà Nội. Mỗi mẫu thịt có trọng lượng 100g, được chứa trong túi PE vô trùng, bảo quản trong thùng đá lạnh rồi đưa ngay về phòng thí nghiệm.

2.2.2 Phương pháp phân lập vi khuẩn

* **Tăng sinh:** trong môi trường Peptone Water Buffer có bổ sung kháng sinh vancomycin 8 mg/lít, cefuroxim 10 mg/lít và cefixime 0.05 mg/lít. Điều kiện tăng sinh là 41-42⁰C trong 6 giờ, mẫu sữa tăng sinh ở 41-42⁰C trong 24 giờ.

* **Phân lập trên môi trường đặc hiệu:** thạch Mac Conkey có bổ sung D-sorbitol 1%, và cefixime 0.05 mg/lít. Trên môi trường này, vi khuẩn *E.coli* O157:H7 có màu vàng nâu nhạt do không lên men đường sorbitol.

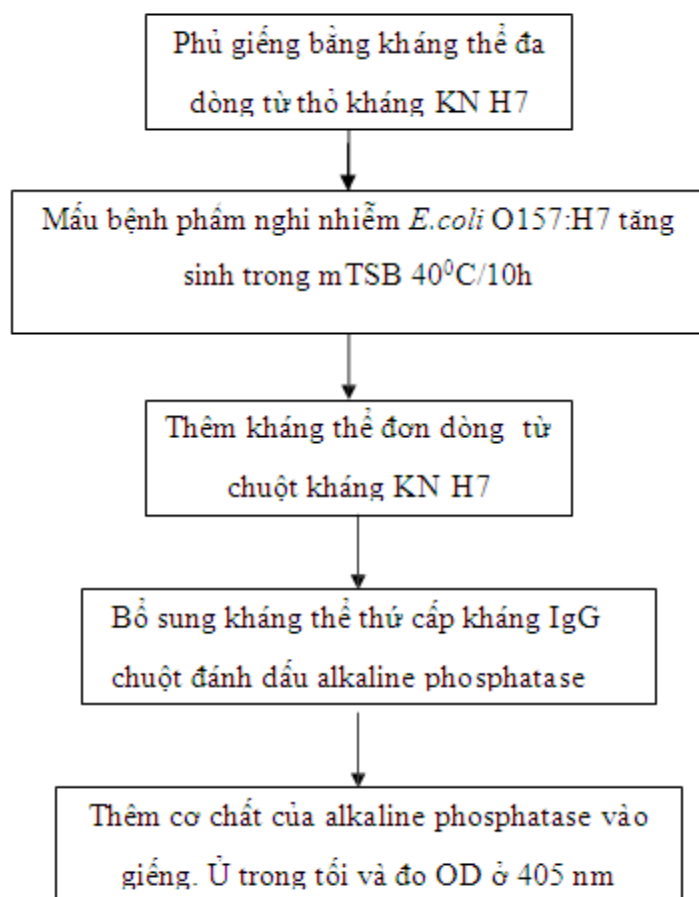
2.2.3 Phản ứng Sandwich-ELISA

Phản ứng *Sandwich-ELISA* được thực hiện tóm tắt như sau: i) kháng thể đa dòng (Pab) ở nồng độ thích hợp được gắn trực tiếp vào đĩa ELISA. Thời gian ủ Pab là qua đêm ở nhiệt độ 4⁰C hoặc 37⁰C trong 2h; ii) Mẫu bệnh phẩm nhiễm *E.coli*, ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ hoặc lắc ở 37⁰C sau 1 giờ; iii) gắn kháng thể đơn dòng (Mab), ủ Mab ở nhiệt độ 37⁰ C, lắc sau 45 phút; iv) Kháng thể cộng hợp gắn enzyme pha loãng bằng PBS với độ pha loãng thích hợp, ủ ở 37⁰C trong 30 phút; v) Cơ chất tạo màu ở nhiệt độ phòng 15 phút; vi) Đọc đĩa trên máy đọc đĩa ELISA ở bước sóng phù hợp.

III. Kết quả và thảo luận

3.1 Thiết lập phản ứng Sandwich -ELISA phát hiện *E.coli* O157:H7

Hai kháng thể đơn dòng A10.16.I và C3.26.IV được sử dụng để thiết lập phản ứng Sandwich -ELISA phát hiện *E.coli* O157:H7 theo sơ đồ 1.1. Hàm lượng các kháng thể đưa vào phản ứng được xác định bằng phương pháp checkerboard.



Sơ đồ 1 Quy trình tóm tắt của phản ứng Sandwich -ELISA phát hiện *E.coli* O157:H7

3.1.1 Xác định hàm lượng kháng thể đa dòng đặc hiệu của *E.coli* O157:H7

Để xác định hàm lượng kháng thể đa dòng, hàm lượng kháng thể đơn dòng được cố định là 1,25 µg/ml và độ pha loãng kháng thể cộng hợp 1/5000, thay đổi nồng độ kháng thể đa dòng theo cột và kháng nguyên H7 theo hàng.

Theo khuyến cáo của nhà sản xuất Nunc, Mỹ, các giếng trong đĩa ELISA-Maxisorp có khả năng gắn được khoảng 50 µl dung dịch protein với nồng độ 0,5 - 10 µg/ml nên chúng tôi sử dụng nồng độ kháng thể đa dòng phủ giếng trong khoảng 50 – 0,391 µg/ml (đây là các nồng độ pha loãng bậc hai theo hàng dọc theo phương pháp checkerboard), để tìm nồng độ kháng thể bão hòa, tức là nồng độ kháng thể tối thiểu cho giá trị OD cao nhất. Nồng độ kháng nguyên H7 là 5,0 µg/ml; 2,5 µg/ml và 1,25 µg/ml. Các giếng đối chứng âm kháng nguyên (blank) không bổ sung protein H7. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và kết quả giá trị OD₄₀₅ trung bình được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Giá trị OD của ELISA với các nồng độ kháng thể đa dòng (Pab)

Nồng độ Pab phủ giếng (µg/ml)	(OD _{TB} - OD _{blank}) ± STD		
	H7 5,0 µg/ml	H7 2,5 µg/ml	H7 1,25 µg/ml
50,000	1,688 ± 0,173	1,358 ± 0,154	1,060 ± 0,107

25,000	1,754 ± 0,258	1,316 ± 0,141	1,070 ± 0,080
12,500	1,568 ± 0,189	1,269 ± 0,109	1,051 ± 0,057
6,250	1,410 ± 0,155	1,147 ± 0,077	0,976 ± 0,068
3,125	1,227 ± 0,162	1,009 ± 0,072	0,863 ± 0,045
1,563	0,902 ± 0,114	0,738 ± 0,075	0,636 ± 0,095
0,781	0,751 ± 0,098	0,510 ± 0,071	0,427 ± 0,071
0,391	0,671 ± 0,129	0,362 ± 0,072	0,292 ± 0,010

Kết quả trong bảng 1 cho thấy giá trị bão hòa kháng thể đa dòng xuất hiện ở nồng độ 12,5 µg/ml ở cả 3 nồng độ kháng nguyên H7 khảo sát (5,0 µg/ml; 2,5 µg/ml và 1,25 µg/ml). Giá trị STD của 3 lần lặp lại thí nghiệm hơi cao ở nồng độ H7 5 µg/ml nhưng vẫn nằm trong khoảng chấp nhận được. Như vậy, nồng độ kháng thể đa dòng phù hợp nhất trong thử nghiệm ELISA là 12,5 µg/ml (tương đương với 625 ng kháng thể/giếng). Nồng độ kháng thể đa dòng này được chọn để tiếp tục khảo sát những thông số tiếp theo.

3.1.2 Khảo sát nồng độ kháng thể đơn dòng (Mab) và kháng thể cộng hợp đánh dấu enzyme (conjugate)

Cổ định nồng độ kháng thể đa dòng là 12,5 µg/ml, nồng độ kháng nguyên H7 là 2,5 µg/ml, chúng tôi thay đổi nồng độ Mab theo hàng và conjugate theo cột theo phương pháp checkerboard để tìm nồng độ bão hòa của chúng.

Trong các nghiên cứu trước đây, nồng độ Mab sử dụng cho phản ứng ELISA thường từ 0,5-4,0 µg/ml, do vậy, chúng tôi chọn khảo sát khoảng nồng độ Mab kháng H7 là 0,08-5µg/ml, pha loãng bậc hai theo cột từ nồng độ 5 µg/ml tới nồng độ 0,08 µg/ml. Conjugate sử dụng ở 3 độ pha loãng 1/1000, 1/5000 và 1/10.000, được pha từ nồng độ gốc của nhà sản xuất (Sigma, Mỹ). Giếng không có Mab (blank Mab) và giếng không có conjugate (blank conjugate) được dùng làm đối chứng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và kết quả phản ứng được xác định bằng giá trị OD405.

Nồng độ Mab kháng H7 bão hòa được xác định trong bảng 1.2, kết quả trong bảng cho thấy điểm bão hòa Mab xuất hiện ở nồng độ 1,25 µg/ml. Giá trị STD của 3 lần lặp lại thí nghiệm nằm trong khoảng chấp nhận được. Vì vậy, chúng tôi chọn nồng độ Mab tối ưu cho phản ứng ELISA là 1,25 µg/ml (tương đương với 62,5 ng kháng thể/giếng).

Bảng 2 Giá trị OD của phản ứng ELISA ở các nồng độ Mab và conjugate

Nồng độ Mab (µg/ml)	(ODTB - ODblank) ± STD		
	Độ pha loãng conjugate		
	1/1000	1/5000	1/10000
5,000	2,595 ± 0,122 ^a	1,445 ± 0,065 ^b	0,780 ± 0,021 ^c
2,500	2,568 ± 0,102 ^a	1,438 ± 0,036 ^b	0,813 ± 0,032 ^c
1,250	2,264 ± 0,255 ^a	1,479 ± 0,081 ^b	0,782 ± 0,071 ^c
0,625	2,417 ± 0,078 ^a	1,342 ± 0,145 ^b	0,749 ± 0,040 ^c
0,313	2,159 ± 0,114 ^a	1,248 ± 0,064 ^b	0,692 ± 0,029 ^c

0,156	1,746 ± 0,121 ^a	1,039 ± 0,095 ^b	0,571 ± 0,029 ^c
0,078	1,303 ± 0,124 ^a	0,766 ± 0,088 ^b	0,425 ± 0,020 ^c

(a, b, c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê)

Cũng trong bảng 2, cho thấy ở mỗi giá trị nồng độ Mab có sự giảm đáng kể của giá trị OD khi giảm độ pha loãng conjugate từ 1/1000 xuống 1/5000, 1/10000. Giá trị STD của 3 lần lặp lại thấp, cho thấy tính ổn định của thí nghiệm. Sự khác biệt về giá trị OD của độ pha loãng conjugate 1/1000, 1/5000 và 1/10000 có sự khác biệt rõ rệt về mặt thống kê. Như vậy độ pha loãng conjugate là 1/1000 cho quy trình ELISA.

3.1.3 Khảo sát tác nhân block giếng

Đối với các thử nghiệm miễn dịch lai trên pha rắn như ELISA thì khi tiến hành trên mẫu, các protein không phải là protein mục tiêu có thể gắn lên bề mặt giếng tại những vị trí không có kháng thể phủ giếng và làm giảm độ nhạy và độ đặc hiệu của quy trình. Tác nhân block giếng được sử dụng để hạn chế hiện tượng này.

Các tác nhân block thường sử dụng trong ELISA là các protein như BSA (bovine serum albumin), sữa gầy hoặc casein, gelatin. Trong thí nghiệm này, ba tác nhân block giếng là BSA, sữa tách bơ (skim milk) và gelatin được khảo sát để tìm ra tác nhân block cho tín hiệu nền thấp nhất cho quy trình ELISA, mỗi giá trị nồng độ của một tác nhân block được lặp lại 3 lần. Các giếng trong thí nghiệm này không bổ sung kháng nguyên H7 mà bổ sung tác nhân block nhằm xem xét tín hiệu nền của phản ứng. Kết quả được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3 Giá trị OD của phản ứng ELISA với các tác nhân block

Tác nhân block	Nồng độ	OD			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình ± STD
BSA	1%	1,007	0,942	0,93	0,960 ± 0,041 ^b
	3%	0,41	0,402	0,388	0,400 ± 0,011 ^c
	5%	0,279	0,264	0,272	0,272 ± 0,008 ^d
Sữa tách bơ	1%	0,150	0,173	0,154	0,159 ± 0,012 ^e
	3%	0,124	0,122	0,129	0,125 ± 0,003 ^e
	5%	0,099	0,095	0,097	0,097 ± 0,001 ^e
Gelatin	1%	0,187	0,149	0,152	0,163 ± 0,002 ^a
	3%	0,101	0,102	0,099	0,101 ± 0,012 ^a

(a, b, c, d, e cho thấy khác biệt có ý nghĩa thống kê)

Giá trị OD thấp nhất đạt được ở nồng độ sữa tách bơ 5% và gelatin 3%. Tuy nhiên, xét về mức độ ổn định của giá trị OD giữa các lần thí nghiệm với các nồng độ khác nhau thì sữa tách bơ thể hiện khả năng hạn chế hiện tượng dương tính giả tốt hơn gelatin. Sự khác biệt về OD giữa ba nồng độ này với các nồng độ còn lại có ý nghĩa thống kê nhưng sự khác biệt giữa chúng thì không có ý nghĩa thống kê. Vì vậy, chúng tôi chọn sữa tách bơ 5% làm tác nhân block giếng cho quy trình ELISA.

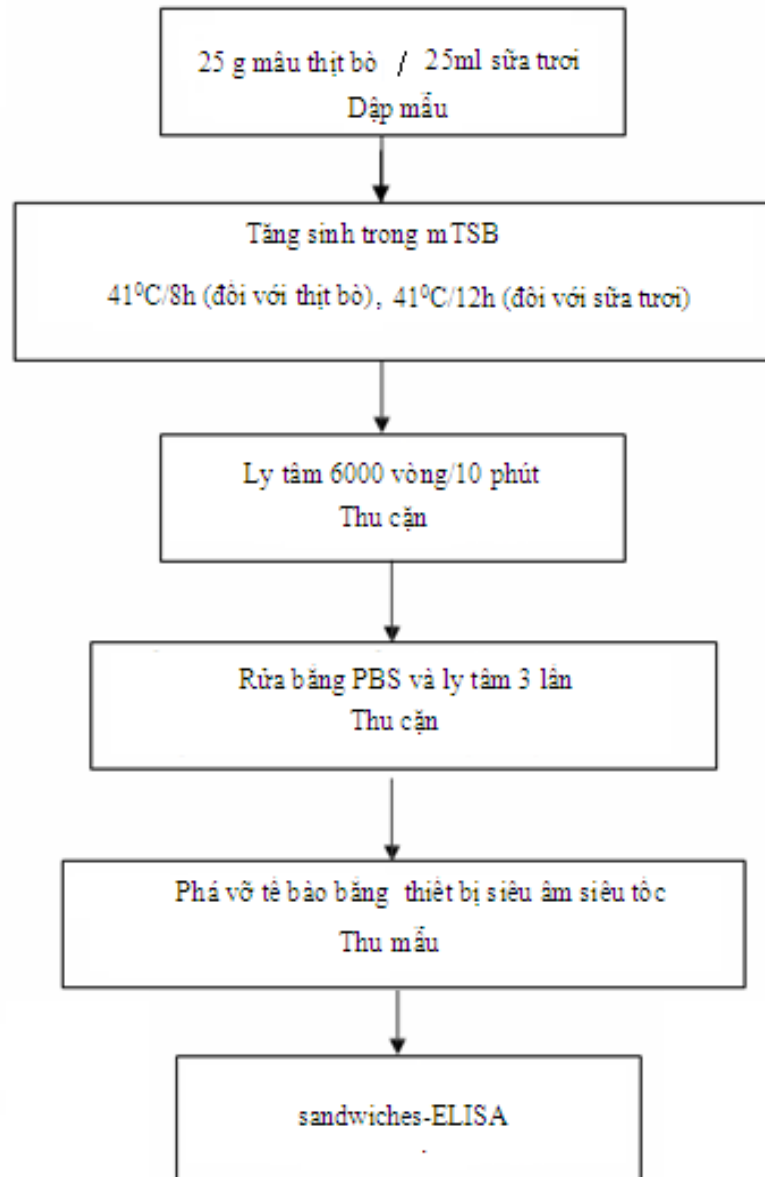
Tóm lại, các thông số của quy trình ELISA được xác định bao gồm :

- Kháng thể đa dòng phủ đĩa: 12,5 µg/ml
- Kháng thể đơn dòng A10.16.I và C3.26.IV: 1,25 µg/ml

- Tác nhân block đĩa: sữa tách bơ 5%
- Conjugate: pha loãng 1/1000

3.2 Áp dụng quy trình phản ứng Sandwich-ELISA để phát hiện *E.coli* O157:H7 trong thực phẩm

414 mẫu thu thập gồm 360 mẫu thịt bò và 54 mẫu sữa tươi bán ở tại Hà Nội được thu thập, xử lý để phát hiện vi khuẩn *E.coli* O157:H7 theo quy trình ở sơ đồ 2 Các mẫu này được kiểm tra song song với phương pháp PCR-multiplex để so sánh hiệu quả phát hiện.



Sơ đồ 2 Quy trình phát hiện *E.coli* O157:H7 trong thực phẩm bằng phản ứng Sandwich- ELISA

15 mẫu thịt bò được xác định âm tính bằng phương pháp nuôi cấy và định type huyết thanh được sử dụng để xác định ngưỡng (cut-off) của phản ứng ELISA, 04 chủng

vi khuẩn *E.coli* O157: H7 ký hiệu là M8, M9, M61, M128 được sử dụng làm đối chứng âm. Kết quả thí nghiệm thu được trong bảng 4.

Bảng 4 Kết quả xác định *E.coli* O157:H7 trong thịt bò và sữa tương bằng phản ứng sandwich-ELISA

ST T	Địa điểm	Loại mẫu	Số mẫu	PCR-multiplex		Sandwich-ELISA			
				Số mẫu (+)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Mab A10.16.I		Mab C3.26.IV	
						Số mẫu (+)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Số mẫu (+)	Tỷ lệ nhiễm (%)
1	H. Đông Anh	Thịt	73	0	0	0	0	0	0
		Sữa	20	0	0	0	0	0	0
2	H. Ba Vì	Thịt	88	1	1,13	1	1,13	1	1,13
		Sữa	28	0	0	0	0	0	0
3	H. Phú Xuyên	Thịt	53	0	0	0	0	0	0
4	H. Thường Tín	Thịt	38	1	2,63	1	2,63	1	2,63
5	Q.Hai Bà Trưng	Thịt	45	0	0	0	0	0	0
6	Q. Hoàng Mai	Thịt	53	0	0	0	0	0	0
		Sữa	6	0	0	0	0	0	0
Tổng số			414	2	0,48	2	0,48	2	0,48

Kết quả trong bảng 1.4 cho phép kết luận rằng: khả năng phát hiện vi khuẩn *E.coli* O157:H7 của phản ứng Sandwich-ELISA là tương đương với phương pháp PCR-multiplex và mức độ phát hiện vi khuẩn của hai kháng thể đơn dòng Mab A10.16.I và Mab C3.26.IV là như nhau.

Tài liệu tham khảo

1. Phạm Thị Tâm, Phạm Công Hoạt, Tô Long Thành, (2011), "Nghiên cứu xác định các điều kiện tối ưu trong quy trình sản xuất kháng thể đơn dòng đặc hiệu với kháng nguyên H7 của vi khuẩn *E.coli* O157:H7". *Tạp chí NN và PTNT số 10 (168), 2011*.
2. TCVN 4833 - 1: 2002 (ISO 3100-1: 1991) Thịt và sản phẩm thịt - Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử - Phần 1: Lấy mẫu
3. Banatvala N., A. R. Magnano, M. L. Cartter, T. J. Barrett, W. F. Bibb, L. L.Vasile, P. Msher, M. A. Lambert-Fair, J. H. Green, N. H. Bean, and R. V.Tauxe (1996), "Meat grinders and molecular epidemiology: two supermarket outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection", *J. Infect. Dis.* 173:480–483.
4. Baqui A. H., R. B. Sack, and R. E. Black (1992), "Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladeshi children 2,5 years of age", *J. Infect. Dis.* 166:792–796.
5. Doyle M. P. and J. L. Schoeni. (1987), " Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry", *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2394- 2396.
6. Yoshihito Kihwaraki (2002). Immunological Laboratory techniques, Japan International Cooperation Agency.