

# Nghiên cứu bước đầu chế tạo bộ Kit phát hiện nhanh *E. coli* trong nước thải sinh hoạt

Nguyễn Thị Tâm Thu<sup>1</sup>, Trần Thị Thanh Quỳnh<sup>1</sup>,  
Trần Thị Huyền Nga<sup>2\*</sup>, Nguyễn Tuấn Anh<sup>2</sup>, Phạm Kiên Cường<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ mới, Viện Khoa học và Công nghệ Quân sự, Số 17 Hoàng Sâm, Cầu Giấy, Hà Nội

<sup>2</sup>Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 15 tháng 6 năm 2016

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 8 năm 2016; Chấp nhận đăng ngày 06 tháng 9 năm 2016

**Tóm tắt:** *E. coli* được xem là vi khuẩn chỉ thị cho sự ô nhiễm vi sinh vật trong nước và thực phẩm. Đã có nhiều phương pháp phát hiện *E. coli* trong nước và thực phẩm nhưng hầu hết các phương pháp đó đều cần các thiết bị đắt tiền, cần thực hiện trong phòng thí nghiệm. Do đó, việc tìm ra công cụ để phát hiện nhanh *E. coli* trong nước và thực phẩm là cần thiết. Công trình này đã nghiên cứu được môi trường tăng sinh cho vi khuẩn *E. coli* đảm bảo đạt tới giới hạn phát hiện bằng que thử trong 8 giờ từ nồng độ ban đầu dưới 20 CFU/ml. Que thử tạo được có độ đặc hiệu đạt trên 90% và ngưỡng phát hiện là  $10^6$  CFU/ml. Kết quả này là cơ sở để chế tạo bộ kit phát hiện nhanh *E. coli* trong nguồn nước sinh hoạt ngay ở điều kiện hiện trường. Bộ kit này dễ dàng được sử dụng cho người dân và bộ đội khi gặp điều kiện bất lợi như sóng, gió, thủy triều hay lũ lụt.

**Từ khóa:** Nước sinh hoạt, ô nhiễm, Kit, Que thử, *E. coli*.

## 1. Mở đầu

Vi khuẩn gây bệnh đường ruột *E. coli* có mặt nhiều trong nước, thực phẩm, có thể sống được trong điều kiện biển đảo (nhiệt độ cao, độ mặn lớn). Các vi khuẩn này thường có mặt trong phân nên rất dễ gây ô nhiễm nguồn nước dự trữ tại các vùng biển đảo do điều kiện sóng, gió và thủy triều. *E. coli* đã được tổ chức y tế thế giới WHO công nhận là vi khuẩn chỉ thị cho sự ô nhiễm vi sinh vật trong nước. Do đó, vi khuẩn này được sử dụng làm đối tượng phát hiện sự ô nhiễm vi sinh vật trong nước sinh hoạt [1].

*E. coli* là một trong những vi khuẩn đứng hàng đầu trong các căn nguyên gây tiêu chảy, viêm đường tiết niệu, viêm đường mật, viêm màng não và viêm phổi (đặc biệt ở trẻ em mới sinh). *E. coli* cũng là một trong các chỉ tiêu môi trường cần giám sát của tất cả các loại nước, từ nước mặt, nước ngầm, nước ăn uống hay nước thải. Khi phát hiện nguồn nước bị nhiễm *E. coli* chúng ta nguồn nước này đã bị nhiễm phân và có thể bị nhiễm nhiều vi sinh vật khác; môi trường ở đó cũng bị ô nhiễm và nguồn nước này cần được xử lý [2].

Hiện nay, việc phát hiện vi khuẩn gây bệnh đường ruột *E. coli* tại hiện trường là rất cấp thiết, đặc biệt tại các vùng biển đảo, vùng bị lũ lụt. Các phương pháp phát hiện vi khuẩn gây bệnh đường ruột hiện đang được sử dụng như

\* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-983077505  
Email: tranthihuyennga@hus.edu.vn

đếm khuẩn lạc, MPN hay PCR thường phải thực hiện trong phòng thí nghiệm và cần các trang thiết bị đắt tiền, người thực hiện phải có chuyên môn sâu. Các phương pháp này không thể thực hiện ngoài hiện trường, đồng thời thời gian thực hiện lâu (từ 6 giờ đối với PCR hay 24 – 48 giờ đối với việc đếm khuẩn lạc, MPN) [3-7]. Do đó, việc phát hiện nhanh và có thể thực hiện ở điều kiện hiện trường phục vụ cho bộ đội công tác ngoài biển đảo, người dân vùng lũ là rất cần thiết. Cho đến nay, mô trong những phương pháp có thể phát hiện nhanh, chính xác các vi sinh vật này ở điều kiện hiện trường có thể sử dụng là dạng que thử dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch [8].

Tuy nhiên, để có thể tạo ra que thử sắc ký miễn dịch có độ nhạy và độ chính xác cao, cần nghiên cứu kỹ các yếu tố liên quan như sử dụng loại kháng thể, nồng độ kháng thể, điều kiện phun kháng thể lên que thử. Mặt khác, trong các mẫu nước sinh hoạt, nồng độ *E. coli* cho phép là dưới 20 CFU/100 ml [2], là giới hạn không thể phát hiện được bằng que thử. Do đó, việc tìm ra môi trường tăng sinh tế bào trong điều kiện biển đảo để có thể tăng số lượng vi sinh vật đến  $10^5 - 10^6$  CFU/ml (giới hạn có thể phát hiện vi sinh vật bằng que thử dạng sắc ký miễn dịch) trong thời gian từ 6 – 8 giờ là cần thiết.

## 2. Nguyên liệu và phương pháp

### 2.1. Nguyên liệu

- Mẫu phân và nước nhiễm *E.coli*.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### *Phân lập vi khuẩn E. coli*

Các vi khuẩn *E. coli* được phân lập từ mẫu phân và mẫu nước nghi nhiễm phân trên môi trường thạch Endo [9] bằng cách pha loãng mẫu theo dãy thập phân. Các khuẩn lạc có màu đỏ có ánh kim trên môi trường thạch Endo có thể là vi khuẩn *E. coli*. Để xác định chính xác chủng vi khuẩn *E. coli* cần định danh chúng vi

khuẩn theo phương pháp giải trình tự 16S rRNA.

#### *Định danh vi khuẩn E. coli*

Các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được định danh theo phương pháp giải trình tự 16S rRNA. Trước hết, lấy khuẩn lạc các chủng vi khuẩn phân lập được để tách DNA theo kit. DNA tổng số của vi khuẩn được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Các mẫu có băng DNA được sử dụng làm khuôn để nhân đoạn gen 16S rRNA bằng phương pháp PCR, sử dụng cặp mồi 27F/1492R [3, 6]. Kết quả nhân đoạn gen 16S rRNA được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Các mẫu có băng với kích thước phù hợp sẽ được gửi đi để giải trình tự. Trình tự 16S rRNA của vi khuẩn được so sánh trên ngân hàng gen quốc tế NCBI. Các chủng có trình tự 16S rRNA tương đồng 99% với chủng *E. coli* sẽ được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

#### *Xác định môi trường tăng sinh phù hợp cho vi khuẩn E. coli*

Chủng vi khuẩn *E. coli* từ khuẩn lạc được hòa vào nước muối sinh lý tạo nồng độ ban đầu. Sau đó pha loãng theo dãy thập phân đến nồng độ  $10^{-8}$ . Từ các nồng độ pha loãng, lấy 100  $\mu$ l dung dịch gốc để gạt đĩa xác định số lượng vi khuẩn trong mẫu ban đầu. Cũng từ các nồng độ này, lấy 5 ml dung dịch pha loãng vào mỗi 100 ml môi trường nuôi cấy (bao gồm các môi trường LB, LST, canh thang thường và lục sáng). Sau khi ủ ở 37°C trong các khoảng thời gian khác nhau 4, 6, 8 giờ, lấy từ mỗi nồng độ ở mỗi môi trường tương ứng 100  $\mu$ l để gạt đĩa, xác định số lượng khuẩn lạc. Môi trường nào có độ tăng số lượng vi khuẩn *E. coli* cao nhất và đạt nồng độ  $10^4 - 10^6$  tế bào từ nồng độ ban đầu thấp nhất sẽ được lựa chọn làm môi trường tăng sinh trong bộ kit phát hiện nhanh vi khuẩn *E. coli* ở điều kiện hiện trường.

#### *Đánh giá phản ứng kháng nguyên kháng thể để lựa chọn kháng thể phù hợp*

Phản ứng kháng nguyên kháng thể được đánh giá dựa trên phương pháp ELISA. Kết quả của phản ứng dựa trên việc đo độ màu của phản ứng.

### Phun kháng thể lên màng

Kháng thể được phun lên màng bằng máy in phun Limonas5. Điều kiện in phun cần độ ẩm < 50%, nhiệt độ < 30°C. Chế độ in phun là tốc độ dòng 20 ml/s, 4 µl/40mm, nồng độ kháng thể 1 mg/ml [7]. Mỗi màng nitrocellulose được phun lên đó 2 vạch tương ứng với kháng thể vạch C (kháng thể đối chứng để nhận biết que thử có giá trị sử dụng hay không), kháng thể vạch T tương ứng với kháng thể bắt cặp với kháng nguyên của *E. coli*, để nhận biết mẫu thử có *E. coli* hay không. Sau khi phun kháng thể lên màng, màng được để khô ở điều kiện phòng (độ ẩm 35 – 50%, nhiệt độ 28 – 29°C) qua đêm. Sau đó màng được cố định bằng dung dịch BSA (huyết thanh bò) 1% trong PBS (dung dịch đệm photphat) trong 10 phút. Rửa lại bằng dung dịch rửa chứa 0,01% SDS. Để khô ở nhiệt độ phòng qua đêm và sử dụng để thử phản ứng.

Đối với kháng thể cộng hợp vàng, vàng được gắn với kháng thể bắt giữ ở nồng độ 20 OD sau đó nhúng trực tiếp màng cộng hợp đã được cố định vào. Sau đó, để khô màng ở điều kiện phòng qua đêm, cắt nhỏ màng và gắn liên kết với màng nitrocellulose và màng hút mẫu tạo que thử.

*Đánh giá độ đặc hiệu và ngưỡng phát hiện của que thử*

Độ đặc hiệu của que thử được đánh giá thông qua phản ứng với tế bào của một số loại vi khuẩn khác như *Klebsiella*, *Listeria*, *V.*

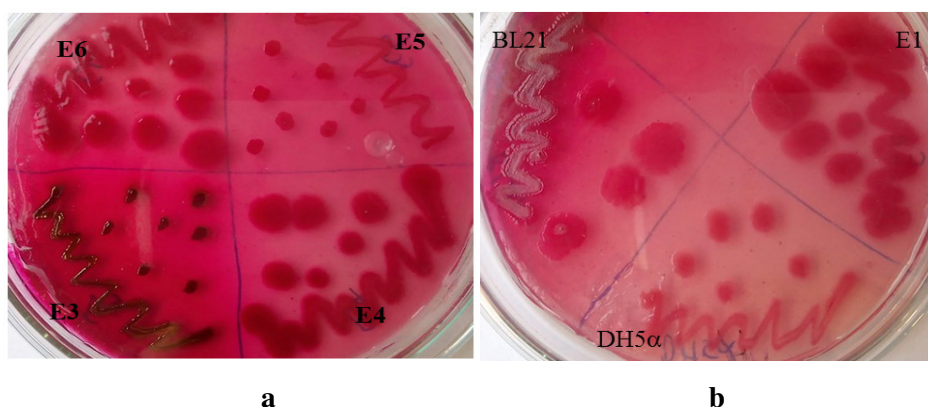
*cholerae*, *Bacillus* xem có phản ứng không. Nếu có phản ứng với các chủng này tức là có phản ứng chéo, độ đặc hiệu kém. Nếu không có phản ứng, độ đặc hiệu cao. Số que được sử dụng cho mỗi phản ứng của một loại vi khuẩn là 10 que (thí nghiệm tiến hành với 4 loại vi khuẩn khác nhau). Độ đặc hiệu được tính là tỷ lệ số que không có phản ứng chéo với tổng số que thử nghiệm [8].

Ngưỡng phát hiện của que thử được đánh giá thông qua nồng độ vi khuẩn thấp nhất cho phản ứng dương tính. Mẫu vi khuẩn *E. coli* được pha loãng ra các nồng độ khác nhau theo dãy thập phân, sau đó dùng que thử nhúng vào các nồng độ vi khuẩn đã biết số lượng (CFU/ml). Nồng độ thấp nhất của vi khuẩn cho phản ứng dương tính với độ lặp lại tốt được gọi là giới hạn phát hiện hay ngưỡng phát hiện của que thử [8].

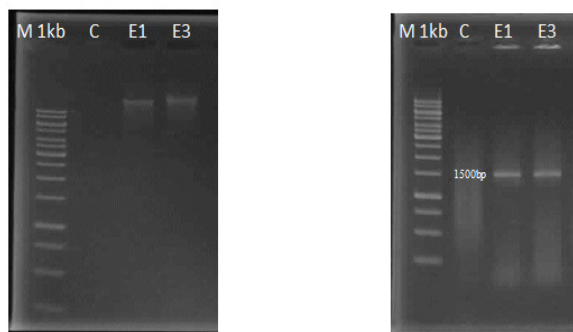
### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Phân lập vi khuẩn *E. coli*

Từ các mẫu phân và mẫu nước nghi nhiễm phân, 6 chủng vi khuẩn nghi ngờ là *E. coli* đã được phân lập. Các chủng này có đặc điểm là có màu hồng đến đỏ, có ánh kim trên môi trường thạch Endo. Các chủng này được lựa chọn, cấy riêng rẽ trên các ống thạch và được sử dụng làm nguyên liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của một số chủng *E. coli* phân lập được và chủng chuẩn DH5α.



Hình 2. Kết quả tách DNA tổng số (a) và PCR của một số chủng *E. Coli* (b)

Ghi chú: M 1kb: marker 1kb; C: mẫu đối chứng, E1: Chủng E1; E3: Chủng E3

### 3.2. Định danh vi khuẩn *E. coli*

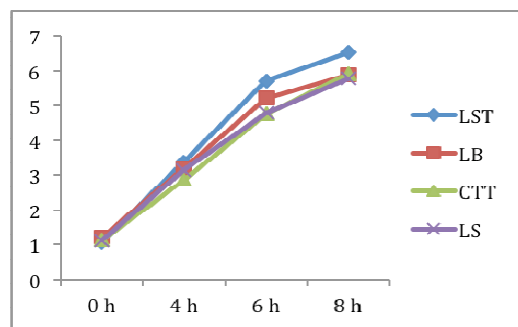
Các mẫu có kết quả tách DNA dương tính được sử dụng làm khuôn để nhân đoạn gen 16S rRNA bằng phương pháp PCR, sử dụng cặp mồi 27F/1492R [3, 6].

Các mẫu có kết quả dương tính (kích thước băng nhận được khoảng 1500 bp, hình 2b) được sử dụng để giải trình tự. Trình tự các chủng nhận được được so sánh trên ngân hàng gen quốc tế NCBI. Các chủng có trình tự tương đồng 99% với các chủng *E. coli* đã công bố sẽ được lựa chọn.

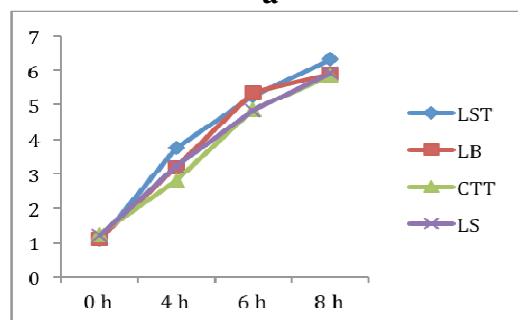
Kết quả trình bày trên Hình 2 cho thấy 2 mẫu E1 và E3 tách được DNA tổng số và nhân được đoạn gen 16S rRNA. Do đó, 2 mẫu này sẽ được tiến hành giải trình tự trên thiết bị giải trình tự thế hệ mới. Kết quả nhận được cho thấy cả 2 mẫu E1 và E3 đều có trình tự tương đồng trên 99% với một số chủng thuộc *E. Coli*. Do đó, các mẫu này được sử dụng như nguồn vi khuẩn *E. coli* có thể lây nhiễm từ phân cho các nghiên cứu tiếp theo.

### 3.3. Xác định môi trường tăng sinh phù hợp cho vi khuẩn *E. coli*

Lựa chọn 1 chủng *E. coli* phân lập được (E3) và 1 chủng *E. coli* chuẩn DH5 $\alpha$  để nuôi cấy trên các môi trường khác nhau nhằm tìm ra môi trường tăng sinh phù hợp sử dụng trong bộ kit.



a



b

Hình 3. Kết quả tăng số lượng vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  (a) và chủng E3 (b) trong các khoảng thời gian khác nhau.

Kết quả trình bày trên Hình 3 cho thấy đối với cả chủng *E. coli* chuẩn và chủng phân lập được từ phân, môi trường LST cho số lượng vi khuẩn tăng nhanh nhất sau 8 giờ và đạt ngưỡng có thể phát hiện được bằng que thử. Do đó, môi trường LST được lựa chọn là môi trường tăng sinh trong bộ kit phát hiện vi khuẩn *E. coli*.

### 3.4. Đánh giá phản ứng kháng nguyên kháng thể để lựa chọn kháng thể phù hợp

Đối với que thử dạng sắc ký miễn dịch, cần sử dụng tới ba loại kháng thể bao gồm kháng thể vạch T, kháng thể vạch C và kháng thể cộng hợp. Kháng thể cộng hợp là kháng thể phải bắt cặp được với kháng nguyên cần phát hiện của *E. coli*. Sau đó, theo dòng chảy của mẫu nước, kháng thể cộng hợp đã bắt giữ kháng nguyên sẽ đi lên vị trí vạch T. Kháng thể vạch T còn gọi là kháng thể phát hiện. Đây là kháng thể sẽ bắt cặp với kháng nguyên tại vị trí epitop khác với kháng thể cộng hợp vàng [8]. Do đó, kháng thể

này sẽ giữ lại các kháng thể cộng hợp đã bắt cặp với kháng nguyên và tạo màu hồng tại vạch T (mẫu dương tính). Các kháng thể không bắt cặp với kháng nguyên sẽ không bị giữ lại tại vạch T và tiếp tục theo dòng mẫu đi lên vạch C. Tại đây, tất cả các kháng thể cộng hợp vàng còn lại sẽ bị bắt giữ do kháng thể cộng hợp vàng bắt cặp với kháng thể vạch C. Do đó, vạch C luôn có màu dù mẫu là dương tính hay âm tính. Để lựa chọn được kháng thể phù hợp với kháng nguyên của *E. coli* và kháng thể tại vạch T, vạch C, cần phải kiểm tra sự bắt cặp của các cặp kháng thể và kháng nguyên này bằng phương pháp ELISA trước khi phun kháng thể lên màng [8].

Từ kết quả ELISA này đã lựa chọn được kháng thể phun lên màng tại vạch C là ab6789 (Abcam), kháng thể phun lên màng tại vạch T là C01805M, kháng thể cộng hợp vàng là C01806M (Meridian Life Science).

### 3.5. Phun kháng thể lên màng

Sau khi lựa chọn được cặp kháng thể tại vạch C, kháng thể cộng hợp vàng và kháng thể tại vạch T, ta tiến hành phun kháng thể lên màng nitrocellulose. Sau khi phun kháng thể lên màng, kháng thể cần được cố định để bảo quản trong nhiều ngày. Sau đó, ta cần thử lại phản ứng với các kháng thể tại vạch T và vạch C để tìm được nồng độ kháng thể tối ưu cần phun lên màng. Kết quả đã lựa chọn được điều kiện tối ưu để phun kháng thể lên màng là độ ẩm dưới 45%, nhiệt độ dưới 30°C, tốc độ phun 20 ml/s với nồng độ kháng thể là 1 mg/ml.

Bảng 1. Ngưỡng phát hiện của que thử phát hiện nhanh *E. coli*

Nồng độ vi khuẩn	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
Số que thử nghiệm	5	5	5	5	5
Số mẫu dương tính	0	0	2	5	5
Tỷ lệ mẫu dương tính	0	0	40%	100%	100%

### 3.6. Đánh giá độ đặc hiệu và ngưỡng phát hiện của que thử

Đối với que thử phát hiện *E. coli*, độ đặc hiệu của que là cần thiết để không có kết quả dương tính giả với các vi sinh vật khác như *V. cholerae*, *Listeria*, *Klebsiella*, *Enterobacter*. Do đó, các que thử cần được đánh giá phản ứng với các vi khuẩn này.

Các dung dịch vi khuẩn với nồng độ khoảng 10<sup>6</sup> CFU/ml đối với mỗi loại vi khuẩn trong dung dịch vàng cộng hợp 5 OD được chuẩn bị để nhúng que thử. Mỗi loại vi khuẩn được nhúng 10 que và ghi lại số mẫu dương tính trong số các mẫu thử. Kết quả thu được cho thấy trong số 4 loại vi khuẩn sử dụng để đánh giá độ đặc hiệu, chỉ có 3 que có dấu hiệu dương tính trong tổng số 40 que thử. Do đó, độ đặc hiệu của que thử là  $(40-3)/40 * 100 = 92,5\%$  (đạt trên 90%).

Đối với ngưỡng phát hiện của que thử, cần tìm ra giới hạn thấp nhất mà có thể phát hiện *E. coli* bằng que thử. Do đó, mẫu ban đầu đã biết nồng độ vi khuẩn được pha loãng thành các nồng độ khác nhau theo dãy thập phân, sau đó sử dụng các que thử nhúng vào mỗi nồng độ vi khuẩn (mỗi nồng độ 5 que lặp lại).

Kết quả trình bày trên Bảng 1 cho thấy ở nồng độ 10<sup>5</sup> CFU/ml, có thể phát hiện được vi khuẩn *E. coli* nhưng tỷ lệ thấp (40%) trong khi nồng độ 10<sup>6</sup> CFU/ml cho số mẫu dương tính là 100%. Do đó, có thể chọn nồng độ vi khuẩn 10<sup>6</sup> là ngưỡng phát hiện của que thử đối với vi khuẩn *E. coli*.

## 4. Kết luận

Đã tìm được môi trường tăng sinh phù hợp để đưa vào bộ kit phát hiện nhanh *E. coli* ngay ở điều kiện hiện trường, có thể tăng số lượng vi khuẩn lên ngưỡng phát hiện được 10<sup>6</sup> CFU/ml trong 8 giờ.

Đã tạo được que thử phát hiện *E. coli* có giới hạn phát hiện 10<sup>6</sup> CFU/ml với độ đặc hiệu > 90%. Đây là cơ sở để chế tạo thành công bộ kit

phát hiện vi sinh vật gây bệnh đường ruột ngay ở điều kiện hiện trường với thời gian phát hiện khoảng 8 giờ.

### Lời cảm ơn

Công trình này hoàn thành với sự hỗ trợ về kinh phí từ đề tài cấp Sở Khoa học Thành phố Hồ Chí Minh: “Nghiên cứu chế tạo kit phát hiện nhanh một số vi sinh vật gây bệnh đường ruột trong nguồn nước sinh hoạt, ứng dụng cho bộ đội đóng quân trên đảo và lực lượng tàu ngầm”. CNĐT TS. Nguyễn Thị Tâm Thu.

### Tài liệu tham khảo

- [1] Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2003. Assessing Microbial Safety of Drinking Water. W.H.O. ISBN 92-94-09946-8.
- [2] Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng nước mặt, nước ngầm, nước thải công nghiệp và nước thải sinh hoạt, 2008.
- [3] A.K Bej, J.L DiCesare, L.Haff, R.M Atlas, 1991b. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Appl Environ Microbiol* 57 (4), 1013–1017
- [4] Nguyễn Thị Ngọc Dao, 2004. Nghiên cứu chế tạo kit phát hiện nhanh, chính xác các vi sinh vật độc hại gây ô nhiễm không khí và nước. Báo cáo tổng kết đề tài nhánh Đề tài cấp Nhà nước, mã số KC.04.10.
- [5] T.S Hammack, P Feng, R.M Amaguana, G.A June, P.S Sherrod, W.H Andrews. Comparison of sorbitol MacConkey and hemorrhagic coli agars for recovery of *Escherichia coli* O157: H7 from brie, ice cream, and whole milk. *J. AOAC Int* 1997; 80:335–340. [PubMed: 9086590].
- [6] L Heijnen, G Medema, 2009. Method for rapid detection of viable *Escherichia coli* in water using real-time NASBA. *Water research* 43, 3124–3132.
- [7] D.R Shelton, J.S Karns. Quantitative detection of *Escherichia coli* O157 in surface waters by using immunomagnetic electrochemiluminescence. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:2908–2915. [PubMed: 11425701].
- [8] C.W Raphael, Y.T Harley, 2009. Lateral flow immunoassay. ISBN: 978-58829-908-6. E-ISBN: 978-1-59745-240-3. DOI 10.1007/978-1-59745-240-3.
- [9] Trần Linh Thuộc, Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm, NXB Giáo dục, 2002.

## Production of Rapid *E.coli* Detection Kit of in Water

Nguyễn Thị Tâm Thu<sup>1</sup>, Trần Thị Thanh Quỳnh<sup>1</sup>,  
Trần Thị Huyền Nga<sup>2</sup>, Trần Thanh Huyền<sup>2</sup>, Phạm Kiên Cường<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of New Technology, Academy of Military Science and Technology, 17 Hoang Sam, Hanoi*

<sup>2</sup>*Faculty of Environmental Sciences, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam*

**Abstract:** *E. coli* is considered the indicator of microbial contamination in water and food. There have been many methods to detect *E. coli* in water and food, but most of them need expensive equipments in a laboratory. Therefore, developing tools to rapidly detect *E. coli* in water and food are needed. This paper present the results on growth medium for *E. coli* to reach the limit of detection by test strips in 8 hours with the original concentration of below 20 CFU/ml. Test strips have specificity of over 90% and the limit of detection is 10<sup>6</sup> CFU/ml. This result is the basis for for *E. coli* rapid detection kit in drinking water supply in field conditions. The kit is easy to use for people under harsh conditions such as waves, wind, tidal or flood .

**Keywords:** Water, contamination, Kit, Test strip, *E. coli*.