

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT LAMP ĐA MỤC TIÊU PHÁT HIỆN VI KHUẨN *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* TRÊN MẪU LÂM SÀNG

Đinh Thị Thu Hằng¹, Cấn Duy Hưng^{1,2}, Bùi Thị Huyền^{1,2}, Nguyễn Thị Lan Hương^{1,2},
Hoàng Xuân Sứ¹, Hồ Anh Sơn¹, Hoàng Văn Tổng¹

¹Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y, Bộ Quốc phòng

²Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, một kỹ thuật Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) có thể phát hiện đồng thời hai vùng gen đích là *orf11* thuộc gen TTSS1 của *Burkholderia pseudomallei* và *GAPDH* là house-keeping gene ở người giúp phát hiện chính xác sự có mặt của vi khuẩn *B. pseudomallei* trong mẫu lâm sàng. DNA tổng số từ dịch nuôi cấy của các chủng đối chứng (*B. pseudomallei*, *Burkholderia cepacia* và *Pseudomonas aeruginosa*) được sử dụng làm khuôn để thiết lập và tối ưu phản ứng LAMP lần lượt với bộ mồi Bp-LAMP gồm 3 cặp mồi là Bp-F3/B3, Bp-FIP/BIP, Bp-LF/LB, và bộ mồi IC-LAMP là IC-F3/B3, IC-FIP/BIP. Kỹ thuật LAMP tối ưu được xác định với các điều kiện như sau: Isothermal Amplification Buffer 1X, *Bst* 2.0 DNA polymerase 4U, các mồi Bp-FIP/BIP, F3/B3, LB/LF có nồng độ lần lượt là 0,64; 0,08; 0,16 μ M; dNTPs 1,4 mM, MgSO₄ 6 mM; DNA 2 μ l, nước khử ion vừa đủ thể tích phản ứng 25 μ l, phản ứng được ủ trong máy ổn nhiệt khô (60°C/ 60 phút, 80°C/ 2 phút). Sản phẩm khuếch đại của kỹ thuật LAMP được đánh giá bằng sự thay đổi màu sắc dưới ánh sáng thường, tia UV và điện di trên gel agarose 1,5%. Đánh giá trên các chủng vi khuẩn đối chứng, kỹ thuật LAMP đa mục tiêu cho phép phát hiện chính xác 22/22 chủng *B. pseudomallei* và không bắt cặp chéo với 3/3 chủng *B. cepacia* và 3/3 chủng *P. aeruginosa*, ngưỡng phát hiện đạt 8 copy/ phản ứng. Đồng thời, kỹ thuật LAMP này cũng cho phép phát hiện chính xác *B. pseudomallei* trên các mẫu máu gây nhiễm giả định với *B. pseudomallei*. Đây là công bố mới về phát triển kỹ thuật LAMP phát hiện 2 mục tiêu là *orf11*-TTSS1 và *GAPDH*, hứa hẹn là công cụ phân tử hữu ích cho phép chẩn đoán nhanh, chính xác, đơn giản *B. pseudomallei* ở Việt Nam.

Từ khóa: *Burkholderia pseudomallei*, phát hiện, gene *orf11*-TTSS1, LAMP, Việt Nam.

MỞ ĐẦU

Burkholderia pseudomallei (*B. pseudomallei*) là vi khuẩn Gram âm hoại sinh ngoài môi trường, tuy nhiên lại gây bệnh melioidosis nguy hiểm ở người và động vật với đặc điểm lâm sàng thường gặp là viêm phổi và đa áp-xe, tỷ lệ tử vong lên đến 40% (Wiersinga *et al.*, 2012). Như vậy, *B. pseudomallei* còn nguy hiểm hơn chủng coronavirus gây hội chứng hô hấp cấp tính nặng năm 2002-2003 (SARS-CoV) bởi tỷ lệ tử vong của bệnh melioidosis cao gấp ba lần. *B. pseudomallei* tồn tại chủ yếu trong bùn đất và nước bề mặt ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới nơi nó đặc hữu (Wiersinga *et al.*, 2015), (Chen *et al.*, 2014). Đã hơn một thế kỷ kể từ khi tác nhân này được phân lập lần đầu tiên vào năm 1911 bởi Alfred Whitmore từ bệnh nhân tiêm morphine tại Rangoon, Myanmar (Whitmore, 1913) nhưng *B. pseudomallei* vẫn còn là thử thách lớn trong y học. Trên thực tế, có thời kỳ *B. pseudomallei* đã bị lãng quên bởi các nhà khoa học do những hạn chế trong hiểu biết về vi khuẩn, các triệu chứng lâm sàng không đặc hiệu của melioidosis với các “triệu chứng mọt” của nhiều bệnh khác như nhiễm trùng không triệu chứng, loét da cục bộ hoặc áp-xe, viêm phổi mạn tính hay sốc nhiễm khuẩn ác tính với áp-xe ở nhiều cơ quan nội tạng. Do đó, *B. pseudomallei* còn được gọi là “kẻ bất chước vĩ đại” khiến nó dễ bị nhầm lẫn trong chẩn đoán lâm sàng cũng như bỏ sót ca bệnh. Đến nay, nhận thức rõ tầm quan trọng trong nghiên cứu về mầm bệnh nguy hiểm này, số lượng công trình về *B. pseudomallei* đang tăng lên nhanh chóng với các minh chứng cho thấy bệnh melioidosis đang ngày càng lan rộng trên toàn cầu, Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Mỹ cũng đã phân loại *B. pseudomallei* thuộc nhóm B, nhóm có khả năng sử dụng làm vũ khí sinh học (Rotz *et al.*, 2002).

Hiện nay, melioidosis vẫn chưa có vắc xin dự phòng, bệnh nhân cần được chẩn đoán chính xác và kịp thời. Nguyên tắc điều trị bệnh melioidosis là phải phối hợp thuốc, các kháng sinh thường được sử dụng là co-trimoxazole và doxycycline, hoặc cũng có thể phối hợp 3 - 4 thuốc, sử dụng liều cao trong 2 tháng đầu và phác đồ duy trì trong 3 - 6 tháng tiếp theo. Điểm nguy hiểm nữa là bệnh melioidosis rất dễ tái phát, do đó việc điều trị mất nhiều thời gian và vô cùng tốn kém. Đặc biệt, *B. pseudomallei* có một cơ chế đề kháng tự nhiên với nhiều loại kháng sinh thông thường được dùng trong điều trị nhiễm trùng dẫn đến tỷ lệ điều trị thất bại cao. Những điều này góp phần lý giải cho việc bệnh melioidosis có tỷ lệ tử vong cao. Chẩn đoán *B. pseudomallei* dựa trên nuôi cấy và định danh cần đến 1 tuần - trong lúc chờ đợi kết quả, bệnh nhân có thể bị suy kiệt và tử vong nhanh chóng (Perumal Samy *et al.*, 2017).

Do đó, một công cụ phát hiện nhanh, đơn giản *B. pseudomallei* trên mẫu lâm sàng cũng như tại hiện trường có vai trò rất quan trọng trong chẩn đoán sớm, điều trị bệnh melioidosis. Tuy nhiên, các nghiên cứu về

B. pseudomallei và bệnh melioidosis ở Việt Nam còn hạn chế. Nhiều ca melioidosis có thể bị bỏ sót vì bác sỹ ít hoặc không có phản xạ lâm sàng về mặt bệnh này. Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt (loop-mediated isothermal amplification -LAMP) là một phương pháp phân tử đơn giản và có giá trị cho chẩn đoán nhanh *B. pseudomallei* so với các kỹ thuật sinh học phân tử thông thường. Hiện nay, các kit thương mại LAMP chủ yếu phát triển cho xác định các mầm bệnh gây ngộ độc thực phẩm và ký sinh trùng. Tuy nhiên, các kit này được thiết kế và phân phối bởi các công ty độc quyền nên giá thành cao, phụ thuộc các trang thiết bị chuyên dụng đi kèm, đó là chưa đề cập đến khía cạnh kit có phù hợp cho chẩn đoán các mầm bệnh vi sinh phân bố ở Việt Nam hay không. Trong xác định *B. pseudomallei* trên thế giới, số công trình nghiên cứu về phát triển kỹ thuật LAMP còn hạn chế và chưa đáp ứng được nhu cầu trong chẩn đoán và điều trị bệnh melioidosis. Chính vì những lý do trên, trong công trình này, nhóm tác giả đã phát triển kỹ thuật LAMP đa mục tiêu mới để ứng dụng phát hiện *B. pseudomallei* trên mẫu lâm sàng, đảm bảo độ nhạy, độ đặc hiệu, dễ dàng sử dụng, góp phần chủ động phòng ngừa bệnh melioidosis.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các chủng vi khuẩn: Hai mươi hai chủng vi khuẩn *B. pseudomallei*, chủng đối chứng âm *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* phân lập từ mẫu máu, đờm, vết thương bệnh nhân được cung cấp bởi Học viện Quân y và Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. Các chủng vi khuẩn này được ký hiệu theo mã nghiên cứu từ Bp1 - Bp22, Bc1-Bc3 và Pa1-Pa3 tương ứng cho *B. pseudomallei*, *B. cepacia*, *P. aeruginosa*.

Bộ mồi LAMP được thiết kế để khuếch đại đặc hiệu vùng *orf11* của gen *TTSS1* (Accession number AF074878, The type III secretion system- hệ thống tiết loại III phân phối độc tố giúp vi khuẩn đưa độc tố vào tế bào chủ) đặc trưng cho *B. pseudomallei*, gồm 03 cặp Bp-F3 (forward primer)/ B3 (backward primer), Bp-FIP (forward internal primer)/ BIP (backward internal primer), Bp- LB (loop backward primer)/ LF (loop forward primer) sử dụng phần mềm PrimerExplorer V5. Ngoài ra, để kỹ thuật có thể ứng dụng trong phát hiện *B. pseudomallei* trên mẫu lâm sàng từ bệnh nhân, bộ mồi chứng nội LAMP phát hiện gen *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) là gen house-keeping ở người được thiết kế bổ sung (mã số NM_001357943.2). Hai bộ mồi LAMP được nhóm nghiên cứu thiết kế, đặt tổng hợp từ hãng IDT (Integrated DNA Technologies, Mỹ) và trình bày chi tiết ở Bảng 1.

Bảng 1. Các mồi sử dụng trong nghiên cứu phản ứng LAMP đa mục tiêu xác định *B. pseudomallei*

Tên mồi	Mục đích	Trình tự (5'-3')	Nhiệt độ gắn mồi (Ta: °C)	Kích thước (bp)
F3	Bp-LAMP	CAATCTCACCAGCGTTCACA	60,01	242
B3		CCGGGCCTCAATTCATCC	59,48	
FIP		GCGCAAGATTGCCTGTCGATCA-CCGCCAACCTTTCCAACA		
BIP		CGGCACAAACCTGACAATCGC-TTCCGCGAACCTGGAAC		
LF		TCGGTAACTCAGCGGATTCC	61,16	
LB		CCTTTTCCCTGGTTTGCTCG	60,98	
IC-F3	IC-LAMP	ACTGCCAACGTGTCAAGT	59,35	182
IC-B3		AGCGTCAAAGGTGGAGGA	59,96	
IC-FIP		CGCCTGCTTCACCACCTTCTTGGACCTGACCTGCCGTCTA	-	-
IC-BIP		CTCAAGGGCATCCTGGGCTACGGTGTGCTGTTGAAGTCA	-	-

Phương pháp

Chủng vi khuẩn được bất hoạt ở điều kiện 80°C/20 phút sau đó tách DNA tổng số theo quy trình của nhà sản xuất (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo scientific, Mỹ). Sản phẩm DNA tổng số thu hồi được xác định nồng độ cũng như độ tinh sạch bằng máy quang phổ. DNA tổng số sau khi kiểm tra đạt chất lượng sẽ được

sử dụng ngay trong phản ứng khuếch đại hoặc bảo quản ở điều kiện -20°C cho sử dụng lâu dài.

Các cặp mồi vòng ngoài là F3/B3 được kiểm tra tính đặc hiệu bằng PCR tiêu chuẩn để khuếch đại gen *orf11*-TTSS1. Sản phẩm PCR có kích thước đúng như tính toán lý thuyết được tinh sạch và giải trình tự Sanger để khẳng định chính xác là vùng gen *orf11*-TTSS1 của *B. pseudomallei*. Thành phần phản ứng LAMP được thiết lập và tối ưu gồm Isothermal Amplification Buffer 1X, Bst 2.0 DNA polymerase (NEB, Mỹ) khảo sát ở các mức 40, 80, 160 và 320 U/ml, các mồi Bp-FIP/BIP, F3/B3, LB/LF có nồng độ ban đầu lần lượt theo khuyến cáo là 1,6; 0,2; 0,4 μ M, khảo sát ở các mức pha loãng là 0,2X, 0,4X, 0,5X, 0,6X, 0,8X và 1X; dNTPs từ 0,4 - 1,6 mM và MgSO₄ từ 2-4-6-8 mM, bởi trong thành phần đệm đã có sẵn 2 mM MgSO₄; DNA 2 μ l (10⁵ copy/ μ l), nước khử ion đủ thể tích phản ứng 25 μ l. Phản ứng được ủ trong máy ổn nhiệt khô để khuếch đại sản phẩm ở nhiệt độ (50, 53, 55, 60, 62, 64 và 68°C)/ (15-30-45-60-90 phút), sau đó hoàn thành phản ứng tại 80°C/ 2 phút (Notomi *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2014).

Để xác định giới hạn phát hiện, mẫu DNA tổng số của Bp1 từ nồng độ ban đầu 10⁸ copy/ μ l được pha loãng theo dải nồng độ 10³-10²-10¹-4-2-1 copy/ μ l (mỗi mức lặp lại 2 lần), khảo sát với thành phần điều kiện của phản ứng LAMP tối ưu. Sản phẩm của phản ứng LAMP được đánh giá bằng mắt thường nhờ bổ sung SYBR Green I (Invitrogen, Mỹ). Hỗn hợp phản ứng chuyển từ màu vàng cam sang màu xanh lá mạ chứng tỏ có phản ứng khuếch đại, được xác định là dương tính với *B. pseudomallei*, còn âm tính khi hỗn hợp phản ứng không chuyển màu. Chụp ảnh dưới ánh sáng UV, mẫu dương tính phát sáng màu xanh lá mạ, còn mẫu âm không phát sáng. Đồng thời, sản phẩm phản ứng LAMP cũng được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%, nhuộm Ethidium Bromie và soi dưới tia UV (UVP Eppendorf, Đức).

Đồng thời, để kiểm soát quá trình phát hiện *B. pseudomallei* bằng phản ứng LAMP trên mẫu bệnh phẩm lâm sàng, phản ứng phát hiện gen *GAPDH* được tối ưu để thực hiện đồng thời với gen đích phát hiện *B. pseudomallei* giúp kiểm soát quá trình xét nghiệm, tránh hiện tượng âm tính giả. Quá trình thiết kế, tối ưu phản ứng IC-LAMP cũng được thực hiện tương tự như với gen chẩn đoán *orf11*-TTSS1. 10 mẫu máu của người hiến máu tình nguyện được gây nhiễm giả định với dịch nuôi cấy của chủng *B. pseudomallei* Bp1, sau đó tiến hành tách chiết DNA tổng số theo quy trình của bộ GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific, Mỹ). Mẫu DNA tổng số thu hồi được kiểm tra bằng kỹ thuật LAMP đa mục tiêu phát hiện đồng thời sự có mặt của vùng gen *orf11*-TTSS1 của *B. pseudomallei* và gen *GAPDH*.

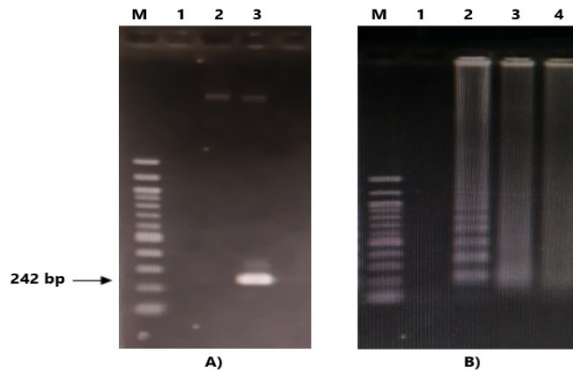
Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại ít nhất 2 lần, có chứng âm và chứng dương, mỗi giá trị khảo sát được chạy lặp 2 (duplicate) để đảm bảo độ chính xác và độ lặp. Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Vi sinh và các mầm bệnh sinh học, Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết lập phản ứng LAMP đa mục tiêu phát hiện các chủng vi khuẩn *B. pseudomallei*

Phản ứng LAMP xác định vi khuẩn *B. pseudomallei* thông qua phát hiện vùng gen *orf11* của TTSS1 được thiết lập trên cơ sở phản ứng LAMP tiêu chuẩn. Để kiểm tra bộ mồi LAMP (gồm 3 cặp) thiết kế có hoạt động tốt hay không, chúng tôi đã sử dụng khuôn là DNA tổng số của *B. pseudomallei* và *B. cepacia*, *P. aeruginosa* đảm bảo tính đặc hiệu. Cặp mồi ngoài Bp-F3/B3 đã khuếch đại sản phẩm đặc hiệu với mẫu *B. pseudomallei* Bp1, có kích thước khoảng 240 bp đúng như tính toán lý thuyết, kết quả giải trình tự nucleotide cũng khẳng định chính xác là vùng gen *orf11*-TTSS1 của *B. pseudomallei*. Các kết quả thử nghiệm bước đầu của bộ mồi LAMP *B. pseudomallei* được thể hiện ở Hình 1.

Theo như thiết kế lý thuyết, bộ mồi Bp LAMP chỉ khuếch đại các vùng gen *orf11*-TTSS1 của *B. pseudomallei* mà không khuếch đại với khuôn DNA của các loài vi khuẩn khác, kể cả các loài có quan hệ gần gũi và tương đồng cao về mặt di truyền như *B. cepacia*, *B. mallei* hay *B. thailandensis*. Trong khuôn khổ nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn các chủng *B. cepacia* để kiểm tra tính đặc hiệu của bộ mồi Bp LAMP. Đồng thời, *P. aeruginosa* cũng được lựa chọn để kiểm tra khả năng bắt cặp chéo của bộ mồi Bp LAMP do đây cũng là trực khuẩn Gram âm gây nhiễm trùng vết thương thường gặp, cũng là loài vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện điển hình. Kết quả thử nghiệm bộ mồi Bp LAMP cho thấy chỉ có khuôn DNA của *B. pseudomallei* được khuếch đại, cho sản phẩm là các mảnh DNA có kích thước khác nhau từ khoảng 200 - 1000 bp thể hiện trên bản gel điện di. Trong khi đó, với các mẫu đối chứng âm (Nước khử ion, *B. cepacia*, *P. aeruginosa*) đều không có sản phẩm khuếch đại (Hình 1).



Hình 1. Kết quả kiểm tra sản phẩm khuếch đại của bộ mồi Bp LAMP trên gel agarose 1,5%

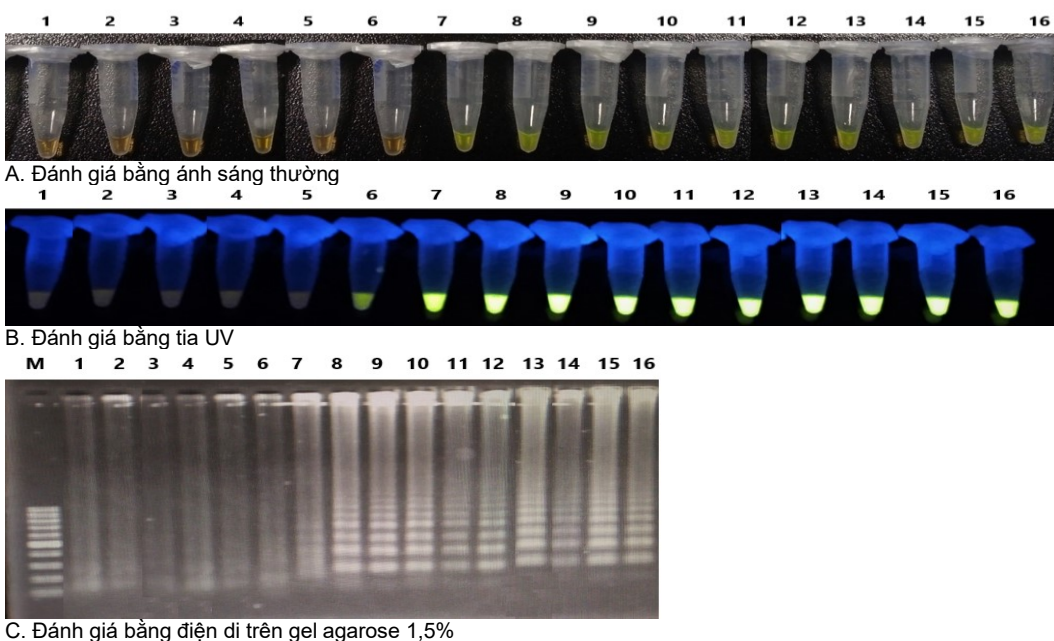
M: Thang DNA chuẩn 100 bp (Thermo Scientific, Mỹ)

- A) 1, 2, 3. Sản phẩm khuếch đại gen *orf11*-TTSS1 của cặp mồi ngoài Bp-F3/B3 trên mẫu đối chứng là nước khử ion, *B. cepacia* Bc1, *B. pseudomallei* Bp3
B) 1, 2, 3, 4: Sản phẩm Bp-LAMP trên mẫu đối chứng là nước khử ion, *B. pseudomallei* Bp3, *B. cepacia* Bc1, *P. aeruginosa* Pa1

Phản ứng LAMP với bộ mồi chứng nội IC-LAMP cũng được thiết lập tương tự, chỉ có thay đổi sử dụng khuôn là mẫu DNA tách chiết từ mẫu máu của người hiến máu tình nguyện. Kết quả bộ mồi IC-LAMP cũng cho phép khuếch đại thành công các vùng gen *GAPDH* của người (số liệu không trình bày). Như vậy, bước đầu đã thiết lập thành công phản ứng LAMP đa mục tiêu với vùng gen đích *orf11* của *B. pseudomallei* và vùng gen *GAPDH* của người, giúp phát hiện chính xác *B. pseudomallei* trong mẫu lâm sàng.

Tối ưu phản ứng LAMP đa mục tiêu xác định *B. pseudomallei*

Để tối ưu phản ứng LAMP đa mục tiêu, từng bộ mồi là Bp LAMP và IC-LAMP được khảo sát lần lượt từng yếu tố là nhiệt độ, thời gian ủ, các thành phần tham gia phản ứng. Tại mỗi yếu tố khảo sát, giá trị tối ưu được xác định khi cho sản phẩm khuếch đại nhiều hơn thể hiện qua màu của dung dịch khi kết thúc phản ứng (quan sát bằng ánh sáng thường, tia UV) và các band đậm, rõ nét hơn (trên bản gel điện di).



Hình 2. Tối ưu nhiệt độ ủ của phản ứng Bp- LAMP phát hiện vùng gen *orf11*-TTSS1 của *B. pseudomallei*

M. Marker 100 bp 1-2. Đối chứng âm là nước khử ion nhiệt độ ủ là 60°C (lặp lại 2 lần), 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 13-14 và 15-16. Các nhiệt độ ủ tương ứng là 50, 53, 55, 60, 62, 64 và 68°C

Với nhiệt độ ủ, chúng tôi khảo sát dải nhiệt độ ở các mức từ 50 - 68°C. Kết quả, các ống phản ứng của mẫu đối chứng đã không xảy ra phản ứng khuếch đại, chứng tỏ quá trình thao tác đảm bảo. Đồng thời, có sự biến thiên về sản phẩm khuếch đại được tạo thành ở nhiệt độ từ 50 - 68°C. Tại nhiệt độ ủ là 50, 53°C hầu như sản phẩm

khuếch đại không được tạo thành, trong khi đó, tại nhiệt độ 55°C có một số lượng rất nhỏ sản phẩm LAMP. Tại 4 mức còn lại từ 60 - 68°C, sản phẩm LAMP được tạo ra cho phép phân biệt giữa kết quả âm tính - dương tính rõ ràng. Đây cũng là các mức nhiệt độ cho *Bst* DNA polymerase hoạt động hiệu quả. Cụ thể, trong nghiên cứu này, có thể xác định được nhiệt độ ưu tiên với bộ mồi Bp-LAMP là 60°C, cho hiệu suất khuếch đại tốt nhất, với các band điện di đậm, rõ nét (Hình 2). Nhiệt độ này được sử dụng để tối ưu thời gian ủ, kết quả đã xác định được thời gian ủ tối ưu là 60 phút (Dữ liệu không trình bày). Như vậy, điều kiện tối ưu của phản ứng LAMP được xác định là 60°C/ 60 phút và dừng phản ứng ở 80°C/2 phút.

Tiếp theo, các thành phần của phản ứng LAMP lần lượt được tối ưu. Các mồi Bp-FIP/BIP, F3/B3, LB/LF có nồng độ lần lượt là 0,64; 0,08; 0,16 μ M. Nồng độ *Bst* DNA polymerase được xác định tối ưu là 160 U/ml (tương đương 4 U/ phản ứng). Đồng thời, hai thành phần quan trọng khác ảnh hưởng đến hiệu suất khuếch đại của phản ứng LAMP cũng được khảo sát là dNTPs (từ 0,4 - 1,6 mM) và $MgSO_4$ (từ 2-4-6-8 mM), và xác định được giá trị tối ưu lần lượt là 1,4 mM dNTPs, 6 mM $MgSO_4$. Tương tự, phản ứng IC- LAMP cũng đã xác định được các giá trị tối ưu. Các điều kiện tối ưu của phản ứng LAMP đa mục tiêu với thể tích 25 μ l được tổng hợp trong Bảng 2.

Bảng 2. Các thành phần trong phản ứng LAMP được tối ưu với tổng thể tích 25 μ l

A. Bp -LAMP

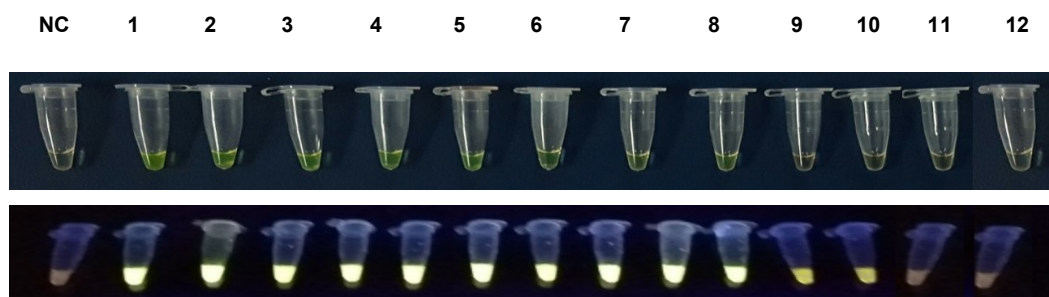
TT	Thành phần	Nồng độ cuối	Thể tích (ul)
	Isothermal Amplification Buffer 10X		2,5
2	<i>Bst</i> DNA Polymerase (8000 U/ml)	160 U/ml	0,5
3	dNTP (10 mM)	1,4 mM	3,5
4	$MgSO_4$ (100 mM)	6 mM	1,5
5	Primer Bp (FIP +BIP) 20 μ M	0,64 μ M	0,8
6	Primer Bp (F3+B3) 2,5 μ M	0,08 μ M	0,8
7	Primer Bp(LB+LF) 5 μ M	0,16 μ M	0,8
8	H ₂ O		12,6
9	DNA		

B. IC-LAMP

TT	Thành phần	Nồng độ cuối	Thể tích (ul)
1	Isothermal Amplification Buffer 10X		
2	<i>Bst</i> DNA Polymerase (8000 U/ml)	160 U/ml	0,5
3	dNTP (10 mM)	1,4 mM	3,5
4	$MgSO_4$ (100 mM)	6 mM	1,5
5	Primer IC (FIP +BIP) 20 μ M	0,64 μ M	0,8
6	Primer IC (F3+B3) 2,5 μ M	0,08 μ M	0,8
7	H ₂ O		13,4
8	DNA		2

Đánh giá kỹ thuật LAMP trên các chủng đối chứng và mẫu lâm sàng gây nhiễm giả định *B. pseudomallei*

Kỹ thuật LAMP tối ưu được đánh giá độ đặc hiệu trên các chủng đối chứng âm có quan hệ gần với *B. pseudomallei* là *B. cepacia* và *P. aeruginosa*. Các mẫu này đều không xảy ra phản ứng LAMP, cho thấy độ đặc hiệu là 100%. Đồng thời, với 22 chủng *B. pseudomallei*, kỹ thuật LAMP đều cho kết quả dương tính. Độ nhạy của phản ứng LAMP tối ưu hay ngưỡng phát hiện được xác định bằng cách khảo sát trên các mức nồng độ pha loãng từ 10^3 - 10^0 copy/ μ l. Chúng tôi đã xác định được ngưỡng phát hiện là 4 copy/ μ l tương đương với 8 copy/ phản ứng, thấp hơn so với kỹ thuật LAMP được phát triển với bộ mồi *orf2*-TTSS1 theo công bố của Chantratita và cs. là 38 copy/ phản ứng (Chantratita *et al.*, 2008) (Hình 3). Kỹ thuật LAMP đa mục tiêu này cũng đã xác định được chính xác *B. pseudomallei* trên 10 mẫu lâm sàng gây nhiễm giả định (Dữ liệu không trình bày).



Hình 3. Độ nhạy của phản ứng Bp LAMP cho phát hiện *B. pseudomallei* khảo sát ở nồng độ DNA 10^3 - 10^2 - 10^1 -4-2-1 copy/ μ l NC. Đối chứng âm là nước khử ion

1-2, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12. Các mức nồng độ 10^3 - 10^2 - 10^1 -4-2-1 copy/ μ l (mỗi mức lặp lại 2 lần)

Hiện nay, kỹ thuật LAMP có thể được phát triển, ứng dụng phong phú và đa dạng, cho phép chẩn đoán trên mọi đối tượng vi sinh vật và các mầm bệnh. Điều đặc biệt là LAMP có rất nhiều ưu điểm hứa hẹn là một phương pháp phân tử đơn giản và có giá trị cho chẩn đoán nhanh các bệnh nhiễm trùng mà không cần những trang thiết bị hiện đại, dễ dàng thực hiện ở các nước đang phát triển vùng nhiệt đới, đặc biệt như ở Việt Nam. Tuy nhiên, kit thương mại của kỹ thuật LAMP chủ yếu phát triển cho xác định các mầm bệnh gây ngộ độc thực phẩm và phát hiện ký sinh trùng, hiện nay trên thế giới mới có một vài công bố về phát triển kỹ thuật LAMP trong xác định *B. pseudomallei*. Công trình của Chantratita và cs. (2008) đã nghiên cứu phát triển kỹ thuật LAMP dựa trên phát

hiện gen đích *orf2*-TTSS1 và đánh giá trên các bệnh nhân nghi ngờ bị melioidosis ở Đông Bắc Thái Lan. Kỹ thuật LAMP có ngưỡng phát hiện là 38 copy/ phản ứng- cao hơn so với kết quả trong nghiên cứu này. Đồng thời, khi đánh giá trên 846 mẫu bệnh phẩm lâm sàng (máu, đờm, nước tiểu, vết thương...) từ 383 bệnh nhân nghi ngờ melioidosis, kỹ thuật LAMP có độ nhạy không cao là 44% (xác định được 34/77 mẫu dương tính đã được xác định bằng nuôi cấy), chỉ cao hơn không nhiều so với kỹ thuật đối chứng là real-time PCR đạt độ nhạy 34%. Mặt khác, kỹ thuật LAMP có độ đặc hiệu chỉ đạt 98,4% vì có 5 mẫu cho kết quả dương tính trên 306 mẫu âm tính đã được xác định bằng nuôi cấy và PCR (Chantratita *et al.*, 2008).

Năm 2016, Michelle Wong Tzeling và cs. giới thiệu kỹ thuật LAMP sử dụng hóa chất có thể đông khô mà vẫn có tính ổn định cao hứa hẹn tiềm năng ứng dụng trong thực tiễn để phát triển các kit chẩn đoán hiện trường dạng “point-of-care” trên mô hình tác nhân *B. pseudomallei*. Tuy nhiên, phần phát triển kỹ thuật LAMP chưa được mô tả chi tiết, cũng chưa cho phép phát hiện gen chứng nội - là bắt buộc trong chẩn đoán lâm sàng để đảm bảo kết quả xác định có độ tin cậy cao (Michelle Wong Tzeling & Yean Yean, 2016). Chính vì vậy, nghiên cứu này đã phát triển một phương pháp khuếch đại DNA dựa trên kỹ thuật LAMP để phát hiện *B. pseudomallei* trong các mẫu bệnh phẩm, góp phần dự phòng bệnh do *B. pseudomallei* gây ra, cho phép chẩn đoán nhanh, chính xác vi khuẩn *B. pseudomallei* tại hiện trường, hơn hẳn phương pháp PCR thường dùng.

KẾT LUẬN

Đã thiết lập và tối ưu thành công kỹ thuật LAMP đa mục tiêu phát hiện đồng thời vùng gen *orf11*-TTSS1 của *B. pseudomallei* và vùng gen *GAPDH* của chứng nội với thành phần phản ứng: nồng độ mỗi Bp-FIP/BIP, F3/B3, LB/LF lần lượt là 0,64; 0,08; 0,16 μ M; Bst 2.0 DNA polymerase 4U, dNTPs 1,4 mM, MgSO₄ 1,6 mM. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở điều kiện 60°C/ 60 phút, 80°C/ 2 phút, đạt giới hạn phát hiện 8 copy/ phản ứng. Kỹ thuật cho phép xác định chính xác *B. pseudomallei* khi thử nghiệm trên 22 chủng nuôi cấy, 10 mẫu lâm sàng gây nhiễm giả định, cũng như không bắt cặp chéo với các chủng *B. cepacia* và *P. aeruginosa*.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành nhờ sự tài trợ kinh phí của Chương trình Công nghệ Sinh học phục vụ an ninh, quốc phòng do Bộ Quốc phòng chủ trì thông qua nhiệm vụ “Xây dựng quy trình và chế tạo bộ kit LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) để chẩn đoán nhanh tại hiện trường vi khuẩn *Burkholderia pseudomallei*”. Mã số: 2019.75.027.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chantratita N, Meumann E, Thanwisai A, Limmathurotsakul D, Wuthiekanun V, Wannapasni S, Tumapa S, Day NP & Peacock SJ (2008) Loop-mediated isothermal amplification method targeting the TTS1 gene cluster for detection of *Burkholderia pseudomallei* and diagnosis of melioidosis. *Journal of clinical microbiology* 46: 568-573.
- Chen YL, Yen YC, Yang CY, Lee MS, Ho CK, Mena KD, Wang PY & Chen PS (2014) The concentrations of ambient *Burkholderia pseudomallei* during typhoon season in endemic area of melioidosis in Taiwan. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2877.
- Michelle Wong Tzeling J & Yean Yean C (2016) A shelf-stable fluorogenic isothermal amplification assay for the detection of *Burkholderia pseudomallei*. *Analyst* 141: 1246-1249.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N & Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research* 28: E63.
- Perumal Samy R, Stiles BG, Sethi G & Lim LHK (2017) Melioidosis: Clinical impact and public health threat in the tropics. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0004738.
- Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM & Hughes JM (2002) Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis* 8: 225-230.
- Su J, Liu X, Cui H, Li Y, Chen D, Li Y & Yu G (2014) Rapid and simple detection of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* by *orfX* loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC biotechnology* 14: 8.
- Whitmore A (1913) An Account of a Glanders-like Disease occurring in Rangoon. *J Hyg (Lond)* 13: 1-34 31.
- Wiersinga WJ, Currie BJ & Peacock SJ (2012) Melioidosis. *N Engl J Med* 367: 1035-1044.
- Wiersinga WJ, Birnie E, Weehuizen TA, *et al.* (2015) Clinical, environmental, and serologic surveillance studies of melioidosis in Gabon, 2012-2013. *Emerg Infect Dis* 21: 40-47.

DEVELOPMENT OF A MULTI-TARGETS LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION ASSAY FOR DETECTION OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* IN CLINICAL SPECIMENS

Dinh Thi Thu Hang¹, Can Duy Hung^{1,2}, Bui Thi Huyen^{1,2}, Nguyen Thi Lan Huong^{1,2},
Hoang Xuan Su¹, Ho Anh Son¹, Hoang Van Tong¹

¹ Institute of Biomedicine and Pharmacy, Vietnam Military Medical University, Ministry of Defence

² Faculty of Biology, Hanoi University of Science, Vietnam National University, Hanoi

SUMMARY

In this study, a novel and highly sensitive Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for simultaneously identification of *orf11*-TTSS1 gene of *Burkholderia pseudomallei* and *GAPDH*, a house-keeping gene in human was developed. DNA was extracted from 22 strains of *B. pseudomallei*, 3 strains of *B. cepacia* and 3 strains of *P. aeruginosa* using GeneJET Genomic DNA Purification Kit. Three primer pairs of Bp-LAMP including Bp-F3/B3, Bp-FIP/BIP and Bp-LF/LB, and two primer pairs of IC-LAMP are IC-F3/B3 and IC-FIP/BIP were designed from the reference sequences on NCBI (Accession number AF074878 and NM_001357943.2) using the PrimerExplorer V5, and synthesized by IDT. The optimized LAMP reaction was determined with the following conditions: 1X Isothermal amplification buffer, 4 U *Bst* 2.0 DNA polymerase, Bp-FIP/BIP, F3/B3, LB/LF primers with concentrations of 0.64; 0.08, 0.16 μ M, respectively, 1.4 mM dNTPs, 6 mM MgSO₄, and amplification was carried out at 60°C for 60 minutes, followed by inactivation at 80°C for 2 minutes. The LAMP assay was sensitive and specific for identification of 22 *B. pseudomallei* as well as 3 strains of *B. cepacia* and 3 strains of *P. aeruginosa*. The limit of detection of established LAMP reaction was 8 copies/reaction. Furthermore, this LAMP assay was able to identify accurately *B. pseudomallei* in blood pseudo-samples contaminated bacteria. This is a novel LAMP assay targeting the TTSS1-*orf11* for detection of *B. pseudomallei* and *GAPDH*, promising a useful molecular tool for rapid, accurate and simple diagnosis of *B. pseudomallei* in Vietnam.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*, detection, TTSS1-*orf11*, LAMP, Vietnam.