

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT LAMP CHẨN ĐOÁN NHANH *NEISSERIA MENINGITIDIS* GÂY VIÊM MÀNG NÃO TẠI TUYẾN ĐƠN VỊ

ThS. NGUYỄN DUY HÀ, ThS. LÊ HẢI YẾN
CN. TRỊNH SAO MAI VÀ CS
Viện Y học dự phòng Quân đội

Phản biện khoa học: TS. NGUYỄN CHÍNH PHONG
Trưởng phòng Vệ sinh phòng dịch, Cục Quân y

TÓM TẮT: Nghiên cứu và phát triển thành công quy trình kỹ thuật LAMP chẩn đoán *N. meningitidis* gây viêm màng não trên các mẫu bệnh phẩm lâm sàng. Trong đó: nồng độ mỗi tối ưu là 1,6 μM FIB, BIP; 0,2 μM F3, B3; 0,4 μM LF, LB; 8 mM Mg^{2+} . Nhiệt độ và thời gian phản ứng tối ưu là 65°C và 45 phút. Giới hạn phát hiện của kỹ thuật là 10^3 copies/phản ứng. Độ nhạy và độ đặc hiệu lý thuyết trên chủng vi khuẩn là 100%. Độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương và giá trị tiên đoán âm của kỹ thuật trên 100 mẫu bệnh phẩm lâm sàng lần lượt là 90%, 98,5%, 96,4% và 95,8%, hệ số kappa giữa hai kỹ thuật là 0,93.

Kỹ thuật LAMP đáp ứng được yêu cầu phát hiện nhanh, chính xác tác nhân gây bệnh do *N. meningitidis*; có thể sử dụng như một công cụ chẩn đoán sớm để sàng lọc ca bệnh và nghiên cứu dịch tễ học trong các vụ dịch do vi khuẩn *N. meningitidis* gây nên.

Từ khóa: *N. meningitidis*, LAMP, viêm màng não, não mô cầu.

ABSTRACT: Research and successful development of LAMP technical process to diagnose *N. meningitidis* causing meningitis in clinical specimens. In which: optimal primer concentration was 1.6 μM FIB, BIP; 0.2 μM F3, B3; 0.4 μM LF, LB; 8 mM Mg^{2+} . The optimal temperature and reaction time was 65°C and 45 minutes. The detection limit of the technique was 10^3 copies/reaction. The sensitivity and theoretical specificity on bacteria strain was 100%. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the technique in 100 clinical specimens were 90%, 98.5%, 96.4% and 95.8%, respectively. The kappa index between the two techniques was 0.93.

The LAMP technique meets the requirement for quick, accurate detection of pathogens caused by *N. meningitidis*; can be used as an early diagnostic tool for screening cases and epidemiological studies in epidemics caused by bacteria *N. meningitidis*.

Keywords: *N. meningitidis*, LAMP, meningitis, meningococcus.

Chịu trách nhiệm nội dung: ThS. Lê Hải Yến, Email: nanglin2010@yahoo.com

Ngày nhận bài: 04/07/2018; mời phản biện khoa học: 10/8/2018; chấp nhận đăng: 25/10/2018.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Viêm màng não do não mô cầu là bệnh truyền nhiễm cấp tính, có thể gây tử vong rất nhanh. Bệnh lây truyền qua đường hô hấp và có khả năng gây thành dịch. Bệnh do vi khuẩn *Neisseria meningitidis* (*N. Meningitidis*) gây ra với các thể lâm sàng đa dạng, như viêm màng não mủ, nhiễm khuẩn huyết, sốc nhiễm khuẩn, viêm khớp, viêm màng ngoài tim... Trong đó, thường gặp và nguy hiểm hơn cả là thể viêm màng não mủ và nhiễm khuẩn huyết. Viêm màng não do não mô cầu hay gặp ở các đối tượng dưới 5 tuổi và từ 19-24 tuổi. Trong Quân đội, viêm màng não do não mô cầu được quan tâm hàng đầu, do bệnh cảnh lâm sàng diễn biến nhanh, có thể gây tử vong trong vòng 24 giờ nếu không được điều trị kịp thời. Vì vậy, xét nghiệm chẩn đoán nhanh, chính xác tác nhân vi sinh vật gây bệnh viêm màng não do vi khuẩn nói chung và *N. meningitidis* nói riêng

luôn là yêu cầu cấp bách. Hiện nay, các kỹ thuật xét nghiệm vi sinh vật kinh điển, như nuôi cấy, PCR... đã không còn phù hợp do thời gian trả kết quả kéo dài (3-5 ngày); điều kiện cơ sở vật chất, trang thiết bị phức tạp, tốn kém; nuôi cấy gần như không phát hiện được mầm bệnh khi bệnh nhân sử dụng kháng sinh trước đó... [1], [2]. Cuộc cách mạng công nghệ sinh học gần đây đã mở ra cơ hội cho các nhà vi sinh y học được tiếp cận thêm nhiều kỹ thuật sinh học phân tử mới [3]. Trong đó, phải kể đến kỹ thuật PCR đẳng nhiệt mạch vòng (khuếch đại ADN ở điều kiện đẳng nhiệt, thông qua cấu trúc vòng với 4 cặp mỗi đặc hiệu nhận diện 6 trình tự cách xa nhau trên ADN đích [5]) và gọi là kỹ thuật LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification). Kỹ thuật này có độ nhạy, độ đặc hiệu rất cao ($\geq 90\%$), thời gian khuếch đại ngắn (< 45 phút), trang thiết bị gọn nhẹ, đơn giản, dễ dàng triển khai trong điều kiện dã chiến.

Trước tình hình dịch não mô cầu trong toàn quân diễn biến phức tạp, khó lường; để phục vụ chẩn đoán và điều trị kịp thời, cứu sống tính mạng người bệnh, nhanh chóng dập tắt dịch bệnh lây lan; chúng tôi triển khai đề tài này nhằm ứng dụng kỹ thuật LAMP trong chẩn đoán nhanh *N. meningitidis* gây viêm màng não; xác định độ nhạy, độ đặc hiệu trên mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

- Quy trình kỹ thuật LAMP.
- Các cặp mồi LAMP phát hiện gen *ctrA* của *N. meningitidis*.
- 100 mẫu bệnh phẩm lâm sàng thu thập tại các vụ dịch trong năm 2017 và 2018.

2.2. Vật liệu, thiết bị sử dụng trong nghiên cứu:

- Vật liệu nghiên cứu:
 - + Chứng dương: chủng *N. meningitidis* lưu giữ tại Khoa Vi sinh vật, Viện Y học dự phòng Quân đội.
 - + Chứng âm: Mẫu âm tính với *N. meningitidis* bằng kỹ thuật PCR.
 - + Các chủng *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *Shigella*, *Salmonella*, *H. influenzae*, *A. baumannii*, *N. mucosa*, *N. perflava* do khoa Vi sinh vật, Viện Y học dự phòng Quân đội cung cấp.
- Sinh phẩm: ADN Cador Magattract Pathogen kit, LAMP Master Mix.
- Thiết bị: bể ủ nhiệt Biosan, giá từ.
- Vật tư tiêu hao: đầu côn 10, 20, 100, 200 μ l; ống nghiệm eppendorf 0,2 ml, 1,5 ml; găng tay...

2.3. Phương pháp nghiên cứu:

- Thiết kế nghiên cứu: thực nghiệm và mô tả.
- Nội dung nghiên cứu và kỹ thuật thực hiện:
 - + Tiêu chí lựa chọn cặp mồi cho LAMP: (1) độ nhạy, độ đặc hiệu cao; (2) phù hợp với chẩn đoán các nhóm huyết thanh *N. meningitidis* gây bệnh đang lưu hành ở Việt Nam; (3) độ phù hợp cao nhất với các chủng *N. meningitidis* gây bệnh trên ngân hàng gen. Phương pháp lựa chọn: tham khảo các nghiên cứu đã công bố trên thế giới; sử dụng các công cụ tin sinh học (phần mềm thiết kế mồi Primer 3 và BLAST) kiểm tra các tham số của cặp mồi.

+ Tách chiết và xác định nồng độ ADN: các mẫu, chủng nghiên cứu được tách chiết theo hướng dẫn của sinh phẩm tách chiết ADN Mini Kit (hãng QIAGEN, Đức). Nồng độ ADN xác định bằng máy Nano Drop 2000 Spectrometer, Eppendorf, Đức. Số lượng bản sao vi khuẩn/ μ l tính toán dựa trên công thức: số lượng bản sao (copies/ μ l) = (lượng DNA (ng) x 60.221.023)/(kích thước x 1.109 x 660).

+ Tối ưu phản ứng LAMP: nồng độ mồi FIP và BIP được lựa chọn trên dải 0,8; 1,6; 2,4; 3,2 μ M. Nồng độ $MgCl_2$ được khảo sát trên dải 6; 8; 10; 12; 14 mM. Nhiệt độ phản ứng được thử lần lượt là 59°C, 61°C, 63°C, 65°C, 67°C. Lựa chọn thời gian phản ứng được khảo sát ở 15 phút, 30 phút, 45 phút, 60 phút, 75 phút. Các thành phần khác của phản ứng LAMP thực hiện theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm: 12,5 μ l Master Mix LAMP; 2,5 μ l hỗn hợp mồi LAMP; 7,5 μ l nước và 2,5 μ l mẫu DNA trong tổng thể tích 25 μ l. Kết quả đọc bằng mắt thường qua phát hiện sự chuyển màu của dung dịch phản ứng.

+ Xác định ngưỡng phát hiện kỹ thuật LAMP: ngưỡng phát hiện của phản ứng LAMP được xác định là nồng độ vi khuẩn thấp nhất cho kết quả LAMP dương tính. Thực hiện phản ứng LAMP (đã được tối ưu) lần lượt trên các mẫu ADN đã pha loãng có dải nồng độ từ 1 đến 10^6 copies/ μ l (mỗi thử nghiệm lặp lại 3 lần).

+ Xác định độ đặc hiệu của kỹ thuật: tiến hành phản ứng LAMP trên các mẫu ADN được tách chiết từ 8 loài (30 chủng) vi khuẩn khác thuộc và không thuộc loài *Neisseria* gây bệnh trên người. Độ đặc hiệu của kỹ thuật là tỉ lệ kết quả LAMP âm tính với các chủng vi khuẩn khác *N. meningitidis* trên tổng số các chủng được thử nghiệm.

+ Độ nhạy của kỹ thuật: độ nhạy lý thuyết của kỹ thuật LAMP được xác định là tỉ lệ kết quả LAMP dương tính thử nghiệm trên tổng số 30 chủng vi khuẩn *N. meningitidis* đã được xác định.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.

3.1. Kết quả lựa chọn cặp mồi:

Trình tự mồi sử dụng cho kỹ thuật LAMP được lựa chọn từ nghiên cứu của tác giả James P, Mc Kenna và CS (2011), thiết kế trên trình tự gen *ctrA* của *N. meningitidis*.

Bảng 1. Trình tự mồi được lựa chọn trong nghiên cứu.

Mồi	Trình tự mồi
FIP	CAAACACACCACGCGCATCAGATCTGAAGCCATTGGCCGTA
BIP	TGTTCCGCTATACGCCATTGGTACTGCCATAACCTTGAGCAA
F3	AGC(C/T)AGAGGCTTATCGCTT
B3	ATACCGTTGGAATCTCTGCC
LOOP F	CGATCTTGCAAACCGCCC
LOOP B	GCAGAACGTCAGGATAAATGGA

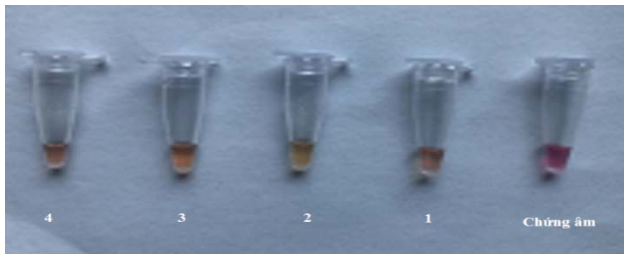
3.2. Kết quả tối ưu kĩ thuật:

3.2.1. Tối ưu nồng độ môi:

- Lựa chọn nồng độ môi:

Nồng độ (µM)	1	2	3	4
FIB, BIP	0,8	1,6	2,4	3,2
F3, B3	0,1	0,2	0,3	0,4
LF, LB	0,2	0,4	0,6	0,8

- Kết quả tối ưu nồng độ môi:



Hình 1. Kết quả tối ưu nồng độ môi.

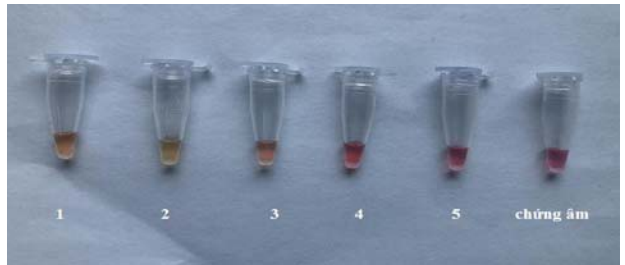
Nồng độ môi tối ưu cho thấy rõ sự chuyển màu là 1,6 µM FIB, BIP; 0,2 µM F3, B3; 0,4 µM LF, LB.

3.2.2. Tối ưu nồng độ MgCl₂:

- Lựa chọn nồng độ MgCl₂:

Mẫu	1	2	3	4	5
Nồng độ MgCl ₂ (mM)	6	8	10	12	14

- Kết quả tối ưu nồng độ MgCl₂:



Hình 2. Kết quả tối ưu nồng độ Mg²⁺.

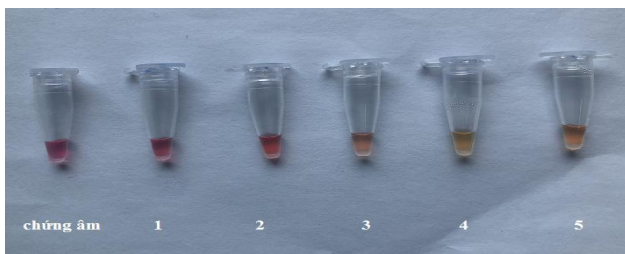
Nồng độ Mg²⁺ tối ưu cho thấy rõ sự chuyển màu là 8 mM.

3.2.3. Tối ưu nhiệt độ phản ứng:

- Lựa chọn nhiệt độ phản ứng:

Mẫu	1	2	3	4	5
Nhiệt độ	59°C	61°C	63°C	65°C	67°C

- Kết quả Tối ưu nhiệt độ phản ứng:



Hình 3. Kết quả tối ưu nhiệt độ phản ứng.

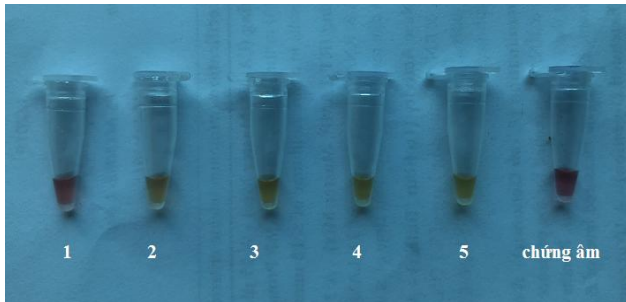
Nhiệt độ gần môi tối ưu cho thấy rõ sự chuyển màu là 65°C.

3.2.4. Tối ưu thời gian phản ứng:

- Lựa chọn thời gian phản ứng:

Mẫu	1	2	3	4	5
Thời gian (phút)	15	30	45	60	75

- Kết quả tối ưu thời gian phản ứng:



Hình 4. Kết quả tối ưu thời gian chạy phản ứng.

Thời gian tối ưu phản ứng cho thấy rõ sự chuyển màu là 45 phút.

3.3. Ngưỡng phát hiện của kĩ thuật:

- Lựa chọn ngưỡng phát hiện của kĩ thuật:

Mẫu	1	2	3	4	5	6	7
Nồng độ DNA (copies/µl)	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶

- Kết quả ngưỡng phát hiện của kĩ thuật:



Hình 5. Kết quả ngưỡng phát hiện của kĩ thuật.

Nồng độ DNA thấp nhất còn cho kết quả dương tính rõ là 10³ copies/µl.

3.4. Độ nhạy và độ đặc hiệu của kĩ thuật:

Bảng 2. Kết quả độ nhạy và độ đặc hiệu của kĩ thuật trên chủng nghiên cứu.

ADN mẫu chứng		N. meningitidis	Vi khuẩn khác	Tổng
Kĩ thuật LAMP	Dương tính	30	0	30
	Âm tính	0	30	30
Tổng		30	30	60
Chỉ số		Se ⁽¹⁾ = 100%	Sp ⁽²⁾ = 100%	

(Ghi chú: ⁽¹⁾: độ nhạy; ⁽²⁾: độ đặc hiệu)

Bảng 3. Kết quả độ nhạy và độ đặc hiệu của kĩ thuật trên mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

Kĩ thuật		Nuôi cấy		Tổng
		Dương tính	Âm tính	
LAMP	Dương tính	27	1	28
	Âm tính	3	69	72
Tổng		30	70	100
Chỉ số		Se = 90%	Sp = 98,5%	Kappa = 0,93

Trong 100 mẫu nhầy họng đã biết kết quả, LAMP cho kết quả dương tính là 27/100 (27%), nuôi cấy cho kết quả dương tính 30/100 (30%). Như vậy, kết quả độ nhạy 90% và độ đặc hiệu là 98,5% với các giá trị dự đoán dương tính và âm tính lần lượt là 96,4%; 95,8%; hệ số Kappa là 0,93.

4. BÀN LUẬN.

Các cặp mồi được lựa chọn trong nghiên cứu đã được James P, Mc Kenna và cộng sự công bố trên thế giới (2011). Cặp mồi này được thiết kế trên vùng gen *ctrA*, là vùng gen bảo thủ, thường được sử dụng cho thiết kế mồi PCR phát hiện mô não cầu. Đặc biệt, qua khảo sát, đây cũng là cặp mồi đặc hiệu với chủng *N. meningitidis* đang lưu hành tại Việt nam. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, cặp mồi có độ nhạy và độ đặc hiệu rất cao, đều là 100% trên các chủng nghiên cứu. Tuy nhiên, hai chỉ số này trên mẫu bệnh phẩm lâm sàng là thấp hơn so với nghiên cứu của James P, Mc Kenna [4]. Sự khác biệt này có thể do tác giả không sử dụng mẫu bệnh phẩm (của bệnh nhân nhiễm vi khuẩn *N. meningitidis*), mà chỉ trộn vi khuẩn vào máu người để thử nghiệm. Vì vậy, đã giảm yếu tố gây ức chế phản ứng LAMP.

Ngưỡng phát hiện của kĩ thuật là 10^3 copies/ μ l, nằm trong giới hạn đã được nghiên cứu của các tác giả khác (từ 10^6 - 10^3 copies/ μ l) [4]. Phản ứng đã được tối ưu trong điều kiện phòng thí nghiệm (thiết bị chính là bể ủ nhiệt khô) và cho các kết quả về nhiệt độ, thời gian phản ứng, nồng độ các thành phần phản ứng không có sự khác biệt lớn so với các nghiên cứu trên thế giới [4], [5]. Riêng sự khác biệt về thời gian được quyết định chính bởi nồng độ ADN đích có mặt trong mẫu thử. Thời gian phản ứng tỉ lệ nghịch với nồng ADN đích. Trong điều kiện trang thiết bị tối giản, dễ triển khai và không yêu cầu phòng xét nghiệm đặc chủng thì

kết quả thu được của kĩ thuật LAMP là rất khả thi và có thể triển khai được tại các địa điểm dã chiến, bảo đảm chẩn đoán nhanh, chính xác tác nhân vi khuẩn *N. meningitidis* gây viêm màng não, đáp ứng hiệu quả cho công tác phòng chống dịch.

5. KẾT LUẬN.

Nghiên cứu và phát triển thành công và ứng dụng kĩ thuật LAMP chẩn đoán nhanh *N. meningitidis* gây viêm màng não trên các mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

- Nồng độ mồi tối ưu là 1,6 μ M FIB, BIP; 0,2 μ M F3, B3; 0,4 μ M LF, LB; 8 mM Mg^{2+} .

- Nhiệt độ và thời gian phản ứng tối ưu là 65°C và 45 phút.

- Giới hạn phát hiện của kĩ thuật là 10^3 copies/phản ứng.

- Độ nhạy và độ đặc hiệu lí thuyết trên chủng vi khuẩn là 100%. Độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương và giá trị tiên đoán âm của kĩ thuật trên 100 mẫu bệnh phẩm lâm sàng lần lượt là 90%; 98,5%; 96,4% và 95,8%; hệ số kappa giữa hai kĩ thuật là 0,93.

Kĩ thuật LAMP đáp ứng được yêu cầu phát hiện nhanh, chính xác tác nhân gây bệnh *N. meningitidis*; có thể sử dụng như một công cụ chẩn đoán sớm, để sàng lọc ca bệnh và nghiên cứu dịch tễ học trong các vụ dịch do vi khuẩn *N. meningitidis* gây nên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Hoàng Thủy Long (1992), *Kĩ thuật xét nghiệm vi sinh vật y học*, Nhà xuất bản Văn hóa, tr. 134-140.
2. Nguyễn Thái Sơn (2011), *Vi sinh vật y học: Học viện Quân y*, Nhà xuất bản Quân đội nhân dân, tr. 214-217.
3. Nông Văn Hải, Quyền Đình Thi (2008), *Những kĩ thuật PCR và ứng dụng trong phân tích DNA: Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và công nghệ, 2, tr. 15-82.
4. James P, Mc Kenna (2011), *Development and clinical validation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of Neisseria meningitides*, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 69, pp. 137-144.
5. Hisatoshi Kaneko (2007), "Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances", *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, pp. 499-501. □