

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG KỸ THUẬT PCR CHẨN ĐOÁN *LEPTOSPIRA SPP.* GÂY BỆNH XOẮN KHUẨN VÀNG DA TRÊN NGƯỜI

ThS. NGUYỄN DUY HÀ

ThS. LÊ HẢI YẾN

ThS. PHẠM THỊ KIM NHUNG

ThS. TRIỆU PHI LONG

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: Xây dựng thành công kỹ thuật PCR chẩn đoán *Leptospira spp.* gây bệnh xoắn khuẩn vàng da trên người. Ngưỡng phát hiện của kỹ thuật là 10^1 copies/ μ l tương đương 10^2 CFU/ml. Độ nhạy PCR trên chủng vi khuẩn là 100%. Độ nhạy PCR trên mẫu huyết thanh của người có chứa vi khuẩn *Leptospira spp.* là 93%. Độ đặc hiệu đạt 100%. Kỹ thuật có thể đáp ứng được yêu cầu xét nghiệm sàng lọc chẩn đoán sớm ca bệnh hoặc giám sát tỉ lệ lưu hành của xoắn khuẩn *Leptospira spp.* tại các tuyến quân y cơ sở, nơi có cơ sở vật chất phòng thí nghiệm chưa được phát triển.

Từ khóa: *Leptospira spp.*, PCR.

ABSTRACT: Successfully conducting PCR method identifying *Leptospira spp.* that causes leptospirosis on human. The threshold of detection is 10^1 copies/ μ l corresponding to 10^2 CFU/ml. The sensitivities on bacteria and human sera with *Leptospira spp.* inoculated were respectively 100% and 93% (26 positive out of 28). The specificity reached 100%. The method can be met the demand of screening examination for early diagnostic of case or surveillance of *Leptospira spp.*'s circulating rate in army units whose laboratory facilities undeveloped.

Keywords: *Leptospira spp.*, PCR.

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

Ngày nhận bài: 17/02/2018; mời phản biện khoa học: 10/3/2018; chấp nhận đăng: 10/4/2018.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Bệnh xoắn khuẩn vàng da là bệnh từ động vật truyền sang người do *Leptospira spp.* gây ra, với các thể lâm sàng đa dạng từ nhiễm khuẩn thể ẩn, thể nhẹ không có vàng da hoặc không có biểu hiện viêm màng não đến thể lâm sàng cấp tính điển hình.

Thể bệnh nặng (còn gọi là hội chứng Weil), ngoài các triệu chứng cơ năng như thể bệnh không vàng da, còn có vàng da, vàng mắt, nước tiểu sẫm màu, xuất huyết và có thể gây tử vong. Theo Tổ chức Y tế thế giới (2007), ước tính hằng năm, trên thế giới có từ 7-9 triệu ca nhiễm *Leptospira*, trong đó, có 58.900 ca tử vong [1]. Ở Việt Nam, thường gặp 12 serovar gây bệnh, phổ biến nhất là *L. interrogans*, có độc lực cao, gây bệnh xoắn khuẩn vàng da.

Hiện nay, quá trình điều trị, điều tra và giám sát dịch do *Leptospira* còn nhiều khó khăn do hạn chế của các kỹ thuật xét nghiệm, các xét nghiệm kinh điển chỉ phát hiện được bệnh ở giai đoạn muộn. Đặc biệt, trong quân đội, nhiều lực lượng thường

xuyên phải hành quân trên những địa bàn có nguy cơ nhiễm bệnh cao, nhưng một số xét nghiệm kinh điển để phát hiện chính xác tác nhân gây bệnh do *Leptospira* còn nhiều hạn chế về thời gian, kỹ thuật, giá thành..., gây khó khăn cho việc chẩn đoán ca bệnh và giám sát dịch.

Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu xây dựng kỹ thuật PCR cơ bản chẩn đoán *Leptospira spp.* nhằm mục đích phát hiện nhanh, chính xác tác nhân gây bệnh xoắn khuẩn vàng da ở giai đoạn sớm và phục vụ công tác giám sát dịch với giá thành không quá cao.

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

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

- Huyết thanh người thu thập tại Viện Y học dự phòng Quân đội.

- Mồi (primer) phát hiện *Leptospira spp.* được thiết kế trên trình tự gen lfb nằm trên locus LA0322 của *L. interrogans* Lai [5] [6].

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

- Vật liệu nghiên cứu:

+ Chứng dương: 1 chủng chuẩn *L. interohaemorrhagiae* gây bệnh do Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

+ Chứng âm: 1 chủng *L. biflexa* không gây bệnh do Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

+ Các chủng *Neisseria meningitidis*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella*, *Leptospira biflexa* (không gây bệnh) lưu giữ tại Khoa Vi sinh vật, Viện Y học dự phòng Quân đội.

+ Đầu côn các loại 10, 20, 100, 200 µl; ống nghiệm eppendorf các loại 0,2 ml, 1,5 ml; găng tay không bột tan.

- Thiết bị: máy PCR Techni (Trung Quốc), máy lắc vortex, máy ủ nhiệt, máy li tâm, bộ điện di, hệ thống đọc gel, tủ an toàn sinh học.

- Sinh phẩm hóa chất: sinh phẩm tách chiết DNA của hãng QIAGEN (Đức), Taq PCR Master mix của hãng QIAGEN (Đức), thạch Agarose, dung dịch TBE 10X và các hóa chất điện di.

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 PCR: (1) có độ nhạy và độ đặc hiệu cao; (2) phù hợp với chẩn đoán các loài *Leptospira* gây bệnh hiện đang lưu hành ở Việt Nam; (3) có độ phù hợp cao nhất với các chủng *Leptospira* gây bệnh trên ngân hàng gen.

Phương pháp lựa chọn: tham khảo các nghiên cứu đã công bố trên thế giới. Sử dụng các cộng cụ tin sinh học như phần mềm thiết kế mồi Primer3 và BLAST để kiểm tra các tham số của cặp mồi.

+ Tách chiết và tinh sạch DNA: các mẫu chủng nghiên cứu được tách chiết theo hướng dẫn của sinh phẩm tách chiết DNA Mini Kit của hãng QIAGEN (Đức).

+ Tối ưu phản ứng PCR: tiến hành khảo sát để lựa chọn nồng độ $MgCl_2$ phù hợp lần lượt là 1,5 mM, 2mM, 2,5mM, 3 mM. Các thành phần khác của phản ứng PCR thực hiện theo hướng dẫn trong bộ sinh phẩm Taq PCR Master Mix của hãng QIAGEN.

Tiến hành khảo sát lựa chọn nhiệt độ bắt cặp mồi phù hợp, lần lượt là 53°C, 55°C, 57°C, 60°C. Thành phần phản ứng PCR sau tối ưu: 2X Master Mix (25 µl); cặp mồi có nồng độ 20 µM (1 µl); hỗn dịch DNA tách chiết (10 µl); $MgCl_2$ nồng độ 25 mM

(1 µl); nước (12 µl). Tổng thể tích 50 µl; điều kiện phản ứng PCR: 94°C - 3 phút; 35 chu kỳ gồm 3 bước: 94°C - 30 giây, 57°C - 45 giây, 72°C - 45 giây; và 72°C - 10 phút, giữ ở 4°C.

+ Xác định ngưỡng phát hiện phản ứng PCR: pha loãng mẫu DNA của chủng chuẩn *Leptospira* gây bệnh từ 10^6 - 10^0 copies/µl. Thực hiện phản ứng PCR (đã được tối ưu) lần lượt trên các mẫu DNA đã pha loãng như trên (mỗi thử nghiệm lặp lại 3 lần).

+ Xác định độ đặc hiệu: tiến hành phản ứng PCR trên các mẫu DNA được tách chiết từ các chủng *Neisseria meningitidis*; *Salmonella*; *Staphylococcus aureus*; *Shigella*; *L. biflexa* (không gây bệnh) và *L. interohaemorrhagiae* (mỗi thử nghiệm được lặp lại 3 lần).

+ Độ nhạy của kỹ thuật PCR: xác định độ nhạy trên các mẫu huyết thanh người, pha các mẫu chứa chủng chuẩn *Leptospira* gây bệnh với nồng độ 10^4 vi khuẩn/ml vào 28 tube, mỗi tube chứa 0,5 ml huyết thanh. Thực hiện tách chiết và phản ứng PCR theo quy trình đã nêu trên. Cách tính độ nhạy, độ đặc hiệu:

Phản ứng	Panel		Tổng
	(+)	(-)	
PCR (+)	a (dương tính thật)	c (dương tính giả)	a + c
PCR (-)	b (âm tính giả)	d (âm tính thật)	b + d
Tổng	a + b	c + d	N = a + b + c + d

- Công thức tính độ nhạy:

$$Se = \frac{a}{a + b} \times 100$$

- Công thức tính độ đặc hiệu:

$$Sp = \frac{d}{c + d} \times 100$$

+ Điện di sản phẩm khuếch đại PCR: phát hiện sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di trên gel thạch (1,2-1,5%), cường độ dòng điện 100V và đọc sản phẩm trên đèn UV.

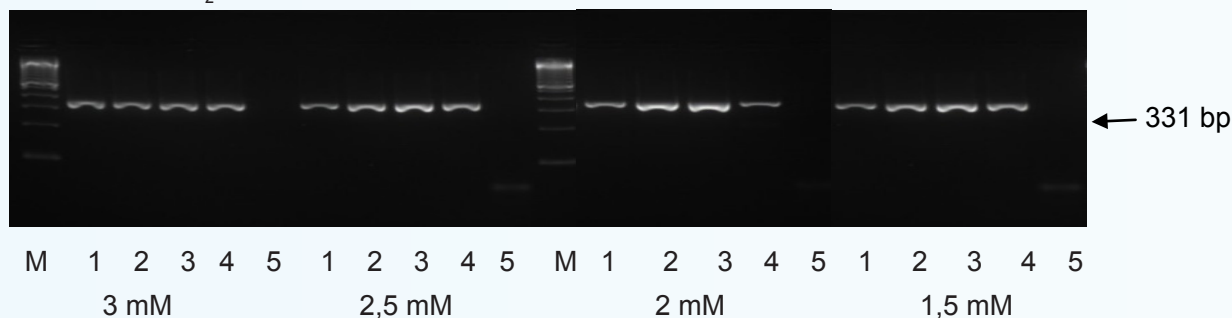
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.

3.1. Kết quả lựa chọn cặp mồi:

Lựa chọn cặp mồi của tác giả Merien (2005), được thiết kế trên trình tự gen locus LA0322 của *L. interrogans* Lai. Mồi xuôi: LFB1-F5'-CATTCATGTTTCGAATCATTTCAAA-3'; mồi ngược: LFB1-R5'-GGCCCAAGTTCTCTTCTAAAAG-3'; sản phẩm khuếch đại 331 bp.

3.2. Kết quả tối ưu phản ứng PCR:

- Nồng độ $MgCl_2$ tối ưu cho phản ứng PCR: 2 mM.



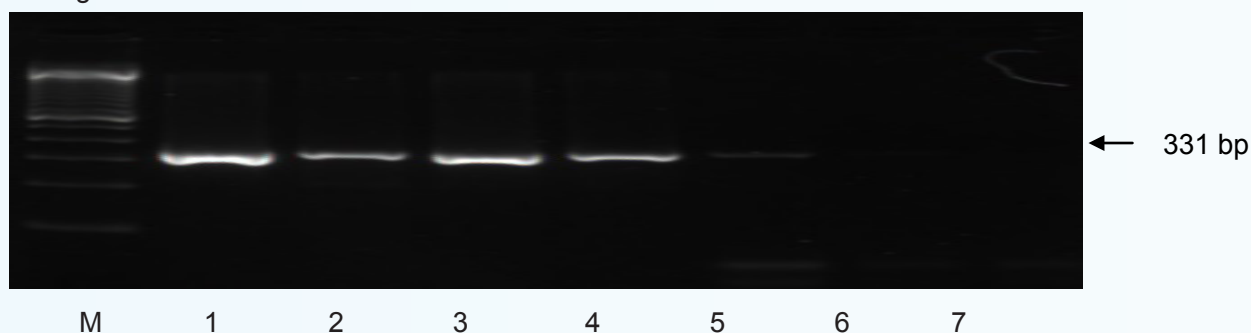
Hình 1: Kết quả khảo sát nồng độ $MgCl_2$, nhiệt độ gắn mồi của phản ứng PCR.

- Nhiệt độ bắt cặp tối ưu cho PCR: 57°C.

M	1	2	3	4	5
Thang chuẩn	53°C	55°C	57°C	60°C	Chứng âm

3.3. Kết quả xác định ngưỡng phát hiện của phản ứng PCR:

Ngưỡng phát hiện của phản ứng PCR là 10^1 copies/phản ứng, tương đương với 10^2 vi khuẩn/ml mẫu. Kết quả ở hình 2 cho thấy nồng độ DNA thấp nhất cho hình ảnh sản phẩm điện di rõ nét là 10 copies/phản ứng.



Hình 2: Kết quả điện di xác định ngưỡng phát hiện của phản ứng PCR.

M	1	2	3	4	5	6	7
Thang chuẩn 100 bp	10^5 copies/ phản ứng	10^4 copies/ phản ứng	10^3 copies/ phản ứng	10^2 copies/ phản ứng	10^1 copies/ phản ứng	1 copies/ phản ứng	Chứng âm

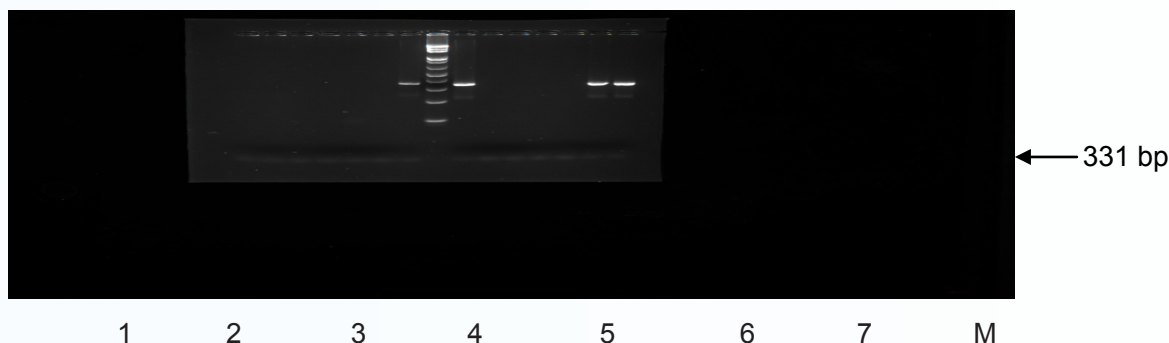
3.4. Kết quả xác định độ đặc hiệu của phản ứng PCR:

- Kết quả xác định độ đặc hiệu của kĩ thuật.

Tên chủng	Số lượng	Kết quả	
		Dương tính	Âm tính
<i>N. meningitidis</i>	7	0	7
<i>Salmonella</i>	5	0	5
<i>S. aureus</i>	6	0	6
<i>Shigella</i> ;	5	0	5
<i>L. biflexa</i>	7	0	7
Tổng	30	0	30

Độ đặc hiệu của phản ứng PCR trên các chủng thử nghiệm là 100%.

- Kết quả ở hình 3 cho thấy, không hình ảnh sản phẩm điện di trên các mẫu thử nghiệm. Điều đó chứng tỏ không có sự bắt cặp chéo giữa cặp mồi sử dụng chẩn đoán *Leptospira* gây bệnh với các trình tự DNA của các loài vi khuẩn khác.



Hình 3: Kết quả điện di độ đặc hiệu của phản ứng PCR.

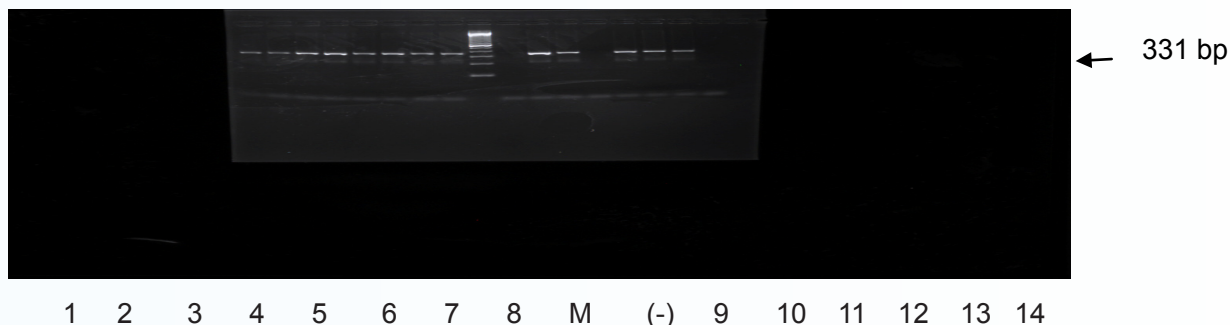
Ghi chú: (1) chứng âm; (2) *N. meningitidis*; (3) *Salmonella*; (4) *S. aureus*; (5) *Shigella*; (6) *L. biflexa*; (7) *L. interrogans*; (M) thang chuẩn 100 bp.

3.5. Kết quả xác định độ nhạy của phản ứng PCR trên mẫu huyết thanh:

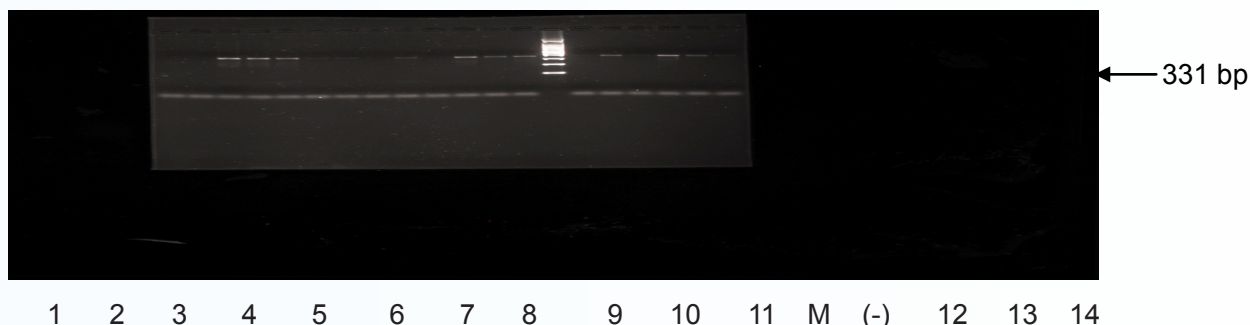
- Kết quả độ nhạy của kỹ thuật.

Tổng số mẫu thử	Kết quả	
	Dương tính thật	Âm tính giả
28	26	2
Tỉ lệ	93%	7%

Độ nhạy của kỹ thuật PCR trên các mẫu huyết thanh chứa chủng *Leptospira* gây bệnh trên người là 26/28 (93%). Kết quả điện di ở hình 4 và hình 5 cho thấy, có 26 mẫu dương tính và 2 mẫu âm tính (giếng 11 trên hình 4 và giếng 8 trên hình 5) với phản ứng PCR trên tổng số 28 mẫu huyết thanh của bệnh nhân.



Hình 4. Kết quả điện di của phản ứng PCR trên mẫu huyết thanh.
(M) Thang chuẩn 100 bp; (-) chứng âm; các số còn lại là mẫu thử nghiệm



Hình 5. Kết quả điện di của phản ứng PCR trên mẫu huyết thanh chứa vi khuẩn *Leptospira* gây bệnh.
(M) thang chuẩn 100 bp; (-) chứng âm; các số còn lại là mẫu thử nghiệm.

4. BÀN LUẬN.

Cặp mồi được lựa chọn sử dụng trong nghiên cứu thiết kế trên vùng gen locus LA0322 của *L. interrogans* Lai, là vùng gen bảo thủ, đặc hiệu đối với nhóm *Leptospira interrogans sensu lato*, bao

gồm 7 loài (phân loại theo gen) gây bệnh đã được xác nhận. Trong số 24 serovar *Leptospira* đại diện cho 24 nhóm huyết thanh đã được F merien và cộng sự (2005) nghiên cứu với cặp mồi này,

(Xem tiếp trang 55)

y được thế giới. Đúng như mong muốn của người sáng lập, nhà bác học Louis Pasteur, viện Pasteur Paris là một tổ chức tư nhân, phi lợi nhuận, nơi dành cho các hoạt động nghiên cứu, sản xuất vắc-xin phòng ngừa bệnh truyền nhiễm, phổ biến các giải pháp phòng bệnh cho cộng đồng. Viện Pasteur Paris đã đưa những phát minh y học đến đại chúng, không chỉ tập trung vào những bệnh dịch tại Pháp, mà còn mở rộng hoạt động ra toàn thế giới, cùng nền y tế thế giới góp phần kiểm soát các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm như dại, uốn ván, bạch hầu, bệnh lao, bại liệt, cúm, sốt vàng da... Viện Pasteur Paris vẫn giữ quan hệ khăng khít và có cơ chế phối hợp với tất cả các viện Pasteur trên thế giới nhằm cung cấp những thông tin, nghiên cứu về các loại bệnh và cùng nhau thúc đẩy công tác dịch tễ, y tế dự phòng, ngăn ngừa sự lan truyền các bệnh do virút hay vi khuẩn, những bệnh dịch mới đe dọa sức khỏe toàn cầu (như H5N1, virút chikungunya, SARS, HIV...). Trong hệ thống các viện Pasteur đã nêu, cho đến nay, vẫn còn nhiều viện Pasteur hoạt động và phát triển tại các quốc gia, trong đó có những nước từng là thuộc địa của Pháp. Điều đó chứng tỏ sự thành công của Louis Pasteur và viện Pasteur Paris trong việc mở rộng mô hình viện Pasteur ra các thuộc địa của Pháp và trên toàn thế giới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Ch Goupillon (1923), *Louis Pasteur 1822-1895*, Imprimerie J.Viêt, Sài Gòn, 1923.
2. *L'institut Pasteur* - <https://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/notre-histoire>.
3. L Gallin (1935), "Pasteur (1822-1895)", *Bulletin de la Société d'enseignement mutuel du Ton kin*, tome XV, N°2.
4. Imprimerie Le-Van-Tan 130-138, Rue du Coton, Hanoi.
5. *L'institut Pasteur*, S.i:Sn, Tài liệu lưu trữ tại Thư viện Quốc gia.
6. *Les grandes découvertes* -
7. *Réseau international des instituts Pasteur*. □

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG KỸ THUẬT PCR CHẨN ĐOÁN *LEPTOSPIRA SPP.* ...

(Tiếp theo trang 35)

có 12 serovar gây bệnh phổ biến (tương ứng với các serovar lưu hành ở Việt Nam) và 12 serovar không gây bệnh, cùng 16 chủng của các loài vi khuẩn khác. Kết quả cho thấy, cặp mồi có độ đặc hiệu 100%. Phản ứng PCR đã được tối ưu hóa trên hai tham số chính là nhiệt độ bắt cặp và nồng độ $MgCl_2$. Kết quả, nhiệt độ bắt cặp tối ưu là $57^{\circ}C$ và nồng độ $MgCl_2$ là 2 mM (khuyến cáo của hãng QIAGEN là 1,5 mM). Ngưỡng phát hiện của phản ứng là 10^1 copies/ μ l; tương đương với khoảng 10^2 vi khuẩn/ml mẫu huyết thanh pha vi khuẩn ban đầu. Theo F merien thì nồng độ vi khuẩn trong máu, nước tiểu ở những ca bệnh nhiễm *Leptospira* có biểu hiện lâm sàng rõ rệt là $\geq 10^4$ vi khuẩn/ml. Như vậy, với ngưỡng phát hiện như trên, kỹ thuật PCR được xây dựng có thể phát hiện được vi khuẩn *Leptospira* trong máu, hoặc nước tiểu của tất cả ca bệnh lâm sàng, thậm chí còn phát hiện được ở giai đoạn trước khởi phát. Độ nhạy (93%) và độ đặc hiệu (100%) của phản ứng PCR tương đương với một số nghiên cứu trên thế giới (độ nhạy dao động từ 90-95%; độ đặc hiệu là 100%).

Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật PCR trong xét nghiệm phát hiện nhanh tác nhân gây bệnh nói chung và *Leptospira* nói riêng giúp tăng cường năng lực chẩn đoán sớm dịch bệnh trong quân đội. Mặt khác, kỹ thuật cũng mang tính khả thi cao do có thể tiết kiệm được giá thành so với các kỹ thuật như realtime PCR hoặc Nested PCR mà vẫn bảo đảm được độ nhạy và độ đặc hiệu dùng cho chẩn đoán.

5. KẾT LUẬN.

Xây dựng thành công kỹ thuật PCR chẩn đoán *Leptospira spp.* gây bệnh xoắn khuẩn vàng da trên người. Ngưỡng phát hiện của kỹ thuật là 10^1 copies/ μ l tương đương 10^2 CFU/ml. Độ nhạy PCR trên chủng vi khuẩn là 100%. Độ nhạy PCR trên mẫu huyết thanh của người có chứa vi khuẩn *Leptospira spp.* là 93%. Độ đặc hiệu đạt 100%.

Kỹ thuật có thể đáp ứng được yêu cầu xét nghiệm sàng lọc chẩn đoán sớm ca bệnh hoặc giám sát tỉ lệ lưu hành của xoắn khuẩn *Leptospira spp.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Nguyễn Hoàng Tuấn (2005), *Bệnh học truyền nhiễm*, NXB Y học, tr. 101-105.
2. Nguyễn Thái Sơn (2011), *Vi sinh vật y học*, Học viện Quân y, NXB Quân đội nhân dân, tr. 214-217.
3. Nông Văn Hải, Quyền Đình Thi (2008), *Những kỹ thuật PCR và ứng dụng trong phân tích DNA*, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, NXB Khoa học tự nhiên và công nghệ, tr. 15-82.
4. Ben Adler (2015), "Leptospira and Leptospirosis", *Microbiology an Immunology*, pp. 79 -81.
5. F merien, P amouriaux , P perolat, G baranton (2005), "Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira spp.* in Clinical Samples", *journal of clinical microbiology*, pp. 2219-24.
6. F Merien, D Portno, P Bourhy, F Charavay, A Berlioz-Arthaud, G Baranton (2005), "A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis", *FEMS Microbiology Letters*, 249, pp. 139-147. □