

<https://doi.org/10.59459/1859-1655/JMM.375>

PHÁT HIỆN NHANH VI-RÚT ĐẬU MÙA KHÍ BẰNG PHƯƠNG PHÁP KHUẾCH ĐẠI ĐẲNG NHIỆT TRUNG GIAN VÒNG LẶP (LAMP)

Lê Thanh Tân^{1*}, Trần Minh Tường¹
Lê Phương Uyên¹, Vũ Thanh Tùng¹
Phạm Ngọc Hùng²

TÓM TẮT

Mục tiêu: Phát triển một quy trình khuếch đại đẳng nhiệt trung gian vòng lặp phát hiện nhanh vi-rút đậu mùa khỉ, đáp ứng yêu cầu chi phí thấp, cho kết quả quan sát được bằng mắt thường.

Phương pháp: Sử dụng phương pháp LAMP với các thành phần phản ứng đã được thương mại hóa bởi New England Biolabs. Gene A27L được lựa chọn làm trình tự mục tiêu, với điều kiện tối ưu, giới hạn phát hiện và độ nhạy của phản ứng được xác định. Sử dụng mẫu huyết thanh pha DNA mục tiêu để bước đầu đánh giá khả năng phản ứng diễn ra trong mẫu mô phỏng lâm sàng.

Kết quả: Phản ứng LAMP phát hiện nhanh vi-rút đậu mùa khỉ xảy ra tối ưu ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 60 phút. Với các điều kiện trên, giới hạn phát hiện đạt được là 10 bản sao và độ nhạy lên đến 100%. Ngoài ra, phản ứng cho kết quả quan sát rõ ở mẫu huyết thanh pha loãng từ 2 lần.

Kết luận: Kết quả cho thấy phương pháp so màu LAMP có thể góp phần chẩn đoán tại hiện trường và tại các phòng khám chữa bệnh với phương tiện xét nghiệm còn hạn chế.

Từ khóa: Monkeypox virus, phương pháp LAMP, qPCR, Gen A27L

ABSTRACT:

Objectives: Developing a LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) process that can rapidly, cost-effectively detect MPV (Monkeypox virus) with visually observable results.

Methods: The LAMP method with reaction components commercially provided by New England Biolabs (NEB) is utilized. Gene A27L is chosen as the target sequence, with the optimal conditions, detection limits, and sensitivity of the reaction are determined. We employ serum samples with the target DNA for an initial assessment of the reaction's feasibility in a clinical-simulated setting.

Results: The LAMP reaction for MPV detection occurs optimally at a temperature of 65°C within a 60-minute timeframe. Under these conditions, the achieved detection limit is 10 copies, and the sensitivity reaches up to 100%. Furthermore, the reaction yields observable results with diluted serum samples from a 2-fold dilution.

Conclusions: The results suggest that the colorimetric LAMP method can contribute to on-site and clinic-based diagnosis in resource-limited testing facilities.

Keywords: Monkeypox virus, LAMP method, qPCR, Gene A27L.

Chịu trách nhiệm nội dung: Lê Thanh Tân, Email: thanhtanhocmon@gmail.com

Ngày nhận bài: 07/11/2023; mời phản biện khoa học: 11/2023; chấp nhận đăng: 15/12/2023.

¹Viện Y học dự phòng Quân đội phía Nam.

²Học viện Quân y.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu mùa khỉ (*Monkeypox virus* - MPV) là một loại vi-rút gây ra bệnh MPV - một trong những căn bệnh truyền nhiễm đã được công bố là tình trạng khẩn cấp toàn cầu năm 2022. Bệnh có các biểu hiện khác nhau trên các cá thể mắc phải (có trường hợp chỉ xuất hiện các triệu chứng nhẹ; có trường hợp xuất hiện các triệu chứng nặng, cần được điều

trị tại cơ sở y tế). Do vậy, cần có kỹ thuật đáng tin cậy để phát hiện sớm sự xâm nhiễm của MPV.

Hiện nay, các kỹ thuật thông dụng chẩn đoán MPV là xét nghiệm phát hiện vật liệu di truyền của vi-rút (PCR) hoặc phát hiện kháng thể (ELISA). So với ELISA, xét nghiệm PCR là phương pháp có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn. Đây cũng là phương pháp được ưu tiên sử dụng hàng đầu trong các

phòng thí nghiệm lớn. Tuy nhiên, phương pháp này còn những hạn chế là cần có trang thiết bị đắt tiền, phòng xét nghiệm theo tiêu chuẩn, kĩ thuật viên đã được đào tạo bài bản, nên không thể triển khai được ở những cơ sở chưa bảo đảm về trang thiết bị hoặc nhân lực phù hợp.

Khuếch đại đẳng nhiệt trung gian vòng lặp (LAMP) do Notomi và cộng sự mô tả lần đầu tiên năm 2000. Đây là một trong các phương pháp có thể được sử dụng để thay thế cho phương pháp PCR. Trên thế giới, một số nghiên cứu đã được công bố sử dụng LAMP để phát hiện MPV và cho kết quả khả quan. Mặc dù vậy, các quy trình LAMP đã công bố vẫn đòi hỏi một số thiết bị chuyên dụng khác như máy điện di, máy UV để đọc kết quả phản ứng.

Trước thực tế trên, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm phát triển một quy trình LAMP có thể phát hiện MPV một cách nhanh chóng, ít tốn kém và cho kết quả quan sát được bằng mắt thường.

2. NỘI DUNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Tối ưu điều kiện của phản ứng LAMP.
- Xác định giới hạn phát hiện của phản ứng MPV LAMP.
- Khảo sát độ đặc hiệu và độ nhạy của phản ứng MPV LAMP.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp LAMP khuếch đại DNA mục tiêu: các thành phần của phản ứng LAMP đã được thương mại hóa bởi New England Biolabs. Mồi và mạch khuôn DNA mục tiêu tổng hợp bởi Phusa Genomic được thêm vào để thực hiện phản ứng. Phản ứng gồm Mastermix, mồi và DNA mạch khuôn được ủ ở nhiệt độ 65°C trong 45 phút.

- Phương pháp PCR: một hỗn hợp phản ứng PCR bao gồm trình tự DNA mục tiêu và 20 µl Mastermix có chứa 1X đệm My Taq, 20 µM mồi xuôi, 20 µM mồi ngược, 5U My Taq HS DNA polimerase.

- Kết quả phân tích dựa trên sự điện di sản phẩm trên gel agarose.

+ Phương pháp điện di: pha 5 µl sản phẩm của phản ứng LAMP/PCR với 1 µl loading dye, sau đó điện di trên gel agarose 1% trong đệm TBE 1X.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

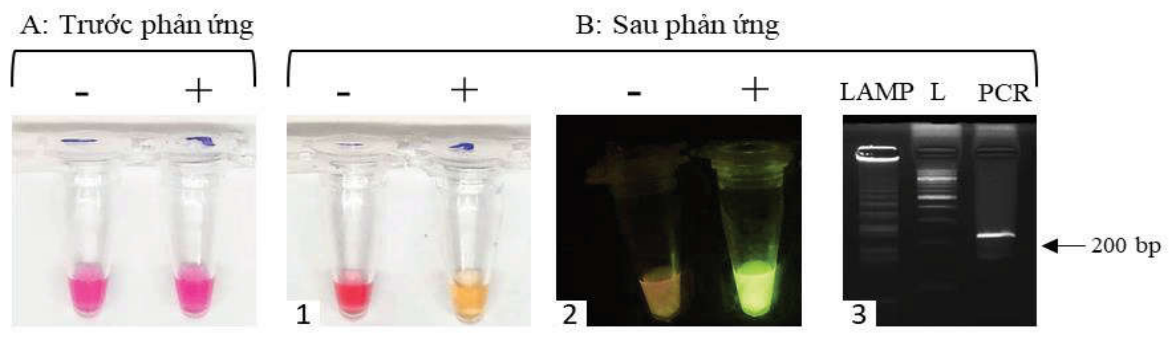
3.1. Tối ưu điều kiện phản ứng

- Xác định thành phần phản ứng MPV LAMP: vùng bảo tồn của gene A27L được lựa chọn làm

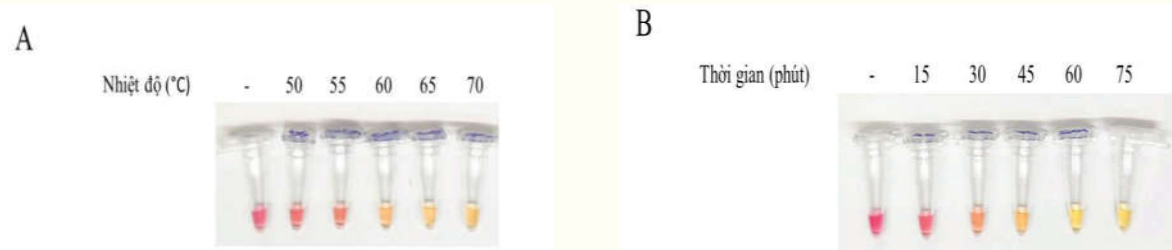
trình tự mục tiêu trong nghiên cứu này, bởi chúng có độ tương đồng 100% giữa các MPV với nhau, nhưng lại có độ tương đồng rất thấp so với các orthoroxvirus khác. Đề tài còn kế thừa bộ mồi do nhóm nghiên cứu Junxia Feng và cộng sự thiết kế để đánh giá cho phản ứng MPV LAMP với sự hiện diện của chất chỉ thị pH trong thành phần 1. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sự thay đổi màu của phản ứng LAMP tương ứng với sự hình thành sản phẩm khuếch đại (hình 1 - B1). Thêm vào đó, trong bước xác định thành phần của phản ứng, mức độ hiệu quả của mồi đã được kiểm tra gián tiếp thông qua việc kiểm tra sự hoạt động của riêng cặp mồi F3, B3 trong bộ mồi LAMP bằng phương pháp PCR truyền thống. Kết quả điện di thấy có xuất hiện duy nhất 1 vạch sản phẩm tại vạch kích thước khoảng 200 bp (hình 1 - B3), trùng khớp với kết quả sản phẩm PCR in silico mà nhóm đã thực hiện trước đó (kích thước sản phẩm khuếch đại là 206 bp), điều này cho thấy, mồi hoạt động tốt và có tính đặc hiệu cao đối với trình tự mục tiêu.

- Khảo sát thời gian và nhiệt độ phản ứng ASFV LAMP: LAMP là phản ứng có thể thực hiện ở điều kiện đẳng nhiệt, dao động trong khoảng nhiệt độ hoạt động tối ưu của Bst DNA polimerase (60-65°C). Ở thí nghiệm này, chúng tôi đánh giá mức độ hoạt động của phản ứng MPV LAMP trong dải nhiệt độ rộng từ 50-70°C, thời gian tối ưu của phản ứng phát hiện ASFV cũng được xác định.

Nhiều nghiên cứu trước đây đã chứng minh phản ứng LAMP diễn ra tốt nhất trong khoảng nhiệt độ trên dưới 60°C, một số trường hợp có thể diễn ra ở nhiệt độ thấp hơn 60°C. Theo khuyến cáo của NEB, khoảng 10-15% phản ứng LAMP có thể diễn ra ở nhiệt độ 37°C [2]. Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy, với bộ mồi và trình tự mục tiêu kèm theo các điều kiện đã lựa chọn, phản ứng có thể diễn ra ở nhiệt độ bắt đầu từ 55°C; tuy nhiên, sự thay đổi màu sắc của phản ứng diễn ra còn mờ nhạt, khó quan sát. Từ nhiệt độ 60°C trở đi, phản ứng LAMP diễn ra mạnh mẽ và có thể quan sát được bằng mắt thường một cách rõ ràng, khi tiếp tục tăng nhiệt độ vượt khoảng nhiệt độ hoạt động tối ưu của Bst DNA polimerase (tối đa 70°C), phản ứng LAMP vẫn có thể xảy ra thể hiện qua sự thay đổi màu sắc không bị giảm sút. Đối với thời gian thực hiện phản ứng, sự khuếch đại có thể nhìn thấy gián tiếp thông qua sự biến đổi màu của phản ứng sau 30 phút, sau 45 phút, sự khác biệt giữa phản ứng âm và dương thể hiện sự khác biệt rõ rệt về màu sắc. Mặc dù vậy, để bảo đảm sự chính xác cho kết quả của các phản ứng LAMP phát hiện MPV, nhiệt độ tối ưu được chọn để phản ứng diễn ra là 65°C trong thời gian 60 phút.



Hình 1. Phản ứng màu MPV LAMP sử dụng khuôn mẫu là gblock DNA. A: hình ảnh mẫu trước khi diễn ra phản ứng LAMP. B1) Sản phẩm khuếch đại được hiển thị bằng sự thay đổi màu từ hồng sang vàng (tín hiệu dương) và đỏ (tín hiệu âm). 1 ng DNA tổng hợp đã được sử dụng làm khuôn mẫu. Các phản ứng được ủ ở 65°C trong 45 phút; B2: sản phẩm LAMP được phân tích bằng cách thêm SyBr Green vào các phản ứng và hiển thị dưới ánh sáng UV; B3: Sản phẩm LAMP được phân tích bằng điện di trên gel agarose và so sánh với kết quả PCR thông thường. Viết tắt, L (Ladder): thang DNA 100bp.



Hình 2. Khảo sát nhiệt độ và thời gian ủ của phản ứng màu MPV LAMP. A: phản ứng được ủ ở các nhiệt độ khác nhau từ 50-70°C trong 45 phút; B: phản ứng được ủ từ 15-75 phút ở 65°C. 1 ng DNA tổng hợp đã được sử dụng làm khuôn mẫu.

3.2. Xác định giới hạn phát hiện (LOD) của phản ứng MPV LAMP

Giá trị LOD của phản ứng LAMP được xác định bằng cách pha loãng liên tục gblock MPV trong nước sinh học phân tử. Kết quả nghiên cứu (hình 3) cho thấy, 10 bản sao (copies) của trình tự gene mục tiêu cho một hỗn hợp phản ứng là giới hạn tối thiểu mà LAMP có thể phát hiện. Theo như nghiên cứu trước đó của Junxia Feng và cộng sự, giới hạn phát hiện đối với cùng một đoạn trình tự gene A27L khi thực hiện bằng phương pháp PCR truyền thống là 2×10^3 copies/phản ứng, cao hơn 1.000 lần, điều này thể hiện mức độ hiệu quả cao và tiềm năng của phản ứng màu MPV LAMP trong việc phát hiện MPV ở các mẫu bệnh phẩm 3.



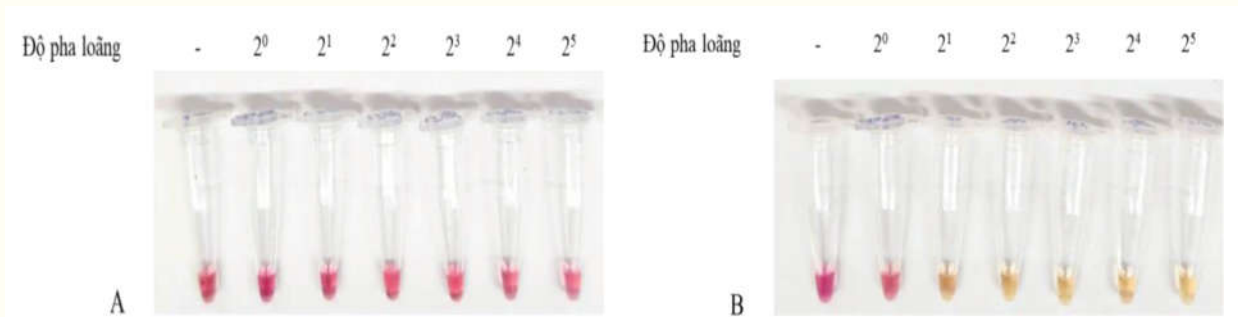
Hình 3. Xác định giá trị giới hạn phát hiện của phản ứng màu MPV LAMP (Sử dụng khuôn mẫu là trình tự mục tiêu DNA MPV tổng hợp).

3.3. Độ đặc hiệu và độ nhạy của phản ứng MPV LAMP

Bộ mồi LAMP được sử dụng đã phát hiện một cách có chọn lọc sự hiện diện của MPV và không phản ứng dương tính nào được ghi nhận đối với bộ gen của các tác nhân khác, như *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*. Ở thí nghiệm tiếp theo, độ nhạy của phản ứng LAMP được đánh giá thông qua việc sử dụng 20 mẫu DNA tổng hợp (âm/dương) ở các nồng độ khác nhau. Kết quả thể hiện LAMP có độ nhạy 100%, tương đương với phương pháp PCR.

Bảng 1. Độ nhạy của phản ứng so màu MPV LAMP (Được đánh giá bằng cách sử dụng DNA tổng hợp của MPV)

Mẫu	LAMP		Tổng
	Mẫu dương	Mẫu âm	
Mẫu dương (n = 15)	15	0	15
Mẫu âm (n = 5)	0	5	5
Tổng cộng (n = 20)	15	5	20
Độ nhạy	100%		



Hình 4. Khả năng phát hiện MPV trong mẫu huyết thanh của phản ứng LAMP. A: màu sắc của hỗn hợp phản ứng ban đầu; B: màu sắc của các hỗn hợp sau 60 phút phản ứng.

3.4. Phản ứng MPV LAMP với mẫu huyết thanh

Công bố trước đây của Junxia Feng (2022) đã xác nhận về sự thành công của phản ứng LAMP khi sử dụng các mẫu bệnh phẩm lâm sàng thô, bao gồm mẫu máu toàn phần [3]. Tuy nhiên, việc sử dụng mẫu bệnh phẩm thô trong xét nghiệm đòi hỏi các bước xử lý ban đầu như pha loãng, đun sôi và li tâm để đưa ra những kết quả rõ ràng nhất. Xét thấy mẫu máu toàn phần chứa nhiều thành phần có khả năng gây trở ngại đến phản ứng khuếch đại, trong khi đó, mẫu huyết thanh lại dễ dàng thu nhận được bằng cách sử dụng máy li tâm cầm tay nhỏ, chúng tôi đã sử dụng mẫu huyết thanh để thực hiện phản ứng LAMP.

Kết quả nghiên cứu (hình 4A) chỉ ra rằng, trực tiếp thêm 1 µl huyết thanh vào hỗn hợp phản ứng làm ảnh hưởng đến màu sắc ban đầu, sau 60 phút phản ứng thì sự đổi màu xảy ra một cách mờ nhạt và khó quan sát (hình 4B). Tiếp theo, mẫu huyết thanh được pha loãng liên tục với nước sinh học phân tử, 1 µl mẫu đã pha loãng sau đó được thêm vào phản ứng LAMP. Kết quả cho thấy sự thay đổi màu sắc có thể được quan sát rõ ràng bắt đầu từ mẫu huyết thanh pha loãng 2 lần (một mẫu huyết thanh chứa MPV được pha loãng liên tiếp trong nước không chứa nuclease để xác định nồng độ thích hợp cho phản ứng LAMP)

4. BÀN LUẬN

Ngày nay, để kiểm soát tốt hơn các bệnh truyền nhiễm tại hiện trường, nhiều phương pháp

chẩn đoán có độ nhạy cao, chính xác và chi phí thấp để ứng dụng thực tế mà không yêu cầu các phòng thí nghiệm đã được phát triển. Real-time PCR vốn được coi là tiêu chuẩn vàng để phát hiện các tác nhân truyền nhiễm, tuy nhiên, qPCR luôn cần những nhân sự lành nghề và những thiết bị giá thành cao. Ngược lại, sự đơn giản trong vận hành và thiết lập đẳng nhiệt làm cho LAMP khả thi hơn cho việc chẩn đoán tại hiện trường. Hơn nữa, với việc sử dụng hai hoặc ba cặp mồi đặc hiệu bổ sung cho các vị trí khác nhau trong vùng mục tiêu, phản ứng LAMP có thể đạt được hiệu suất cực cao về độ nhạy và độ đặc hiệu.

Thay vì điện di agarose thông thường, các sản phẩm được khuếch đại LAMP có thể được quan sát bằng cách sử dụng que thử sắc kí hoặc SyBr Green, một loại thuốc nhuộm chỉ phát huỳnh quang khi gắn với sợi DNA sợi đôi dưới sự hiện diện của nguồn sáng UV [4, 5]. Về ứng dụng khả thi tại hiện trường, sử dụng thuốc nhuộm phù hợp để đọc ngay kết quả phản ứng là phù hợp hơn. Tuy nhiên, việc sử dụng SyBr Green được báo cáo là rất nhạy cảm với sự nhiễm bẩn trong hỗn hợp phản ứng và có thể tạo ra kết quả dương tính giả [5]. Ngoài ra, gần đây, lợi thế về khả năng làm giảm pH của phản ứng LAMP dựa trên việc sản xuất proton xảy ra do hoạt động kéo dài mạch của DNA polymerase, một loại thuốc nhuộm nhạy cảm với pH mà không can thiệp vào phản ứng đã được đưa vào để chỉ ra tín hiệu kết quả [6]. Sự thay đổi màu sắc do giảm pH có thể được đọc bằng mắt thường [6], do đó, việc phát hiện bằng phương pháp so màu cho phép phát hiện sản phẩm khuếch đại một cách kịp thời mà không cần

tốn thời gian thực hiện các bước quan sát tiếp theo cũng như không cần thiết bị chuyên dụng. Hơn nữa, chất chỉ thị pH rẻ hơn đáng kể so với SyBr Green, có lợi hơn khi được phát triển thành một bộ xét nghiệm chẩn đoán tại hiện trường.

Mục đích của nghiên cứu này là ứng dụng và đánh giá xét nghiệm so màu MPV LAMP để phát hiện nhanh chóng và chính xác MPV ở người như một phương pháp thay thế cho qPCR phục vụ cho việc chẩn đoán tại hiện trường. Các điều kiện tối ưu để phát hiện MPV bằng phản ứng so màu LAMP được xác định là 60°C trong 60 phút, thậm chí có thể quan sát thấy sản phẩm khuếch đại sớm hơn sau 30 phút ủ. Bởi vì thời gian thử nghiệm rất quan trọng đối với chẩn đoán bệnh truyền nhiễm tại hiện trường và thực tế kết quả nghiên cứu được xác định một cách rõ ràng bằng mắt thường sau 30-60 phút làm xét nghiệm MPV LAMP. Do vậy, xét nghiệm MPV LAMP là một lựa chọn lí tưởng nhằm phát hiện MPV tại hiện trường. Hơn nữa, xét nghiệm so màu MPV LAMP cực kì nhạy để phát hiện MPV. Mặt khác, không có phản ứng chéo nào được phát hiện với bộ gen của một số vi khuẩn khác, điều này cho thấy rằng xét nghiệm LAMP có tính đặc hiệu cao, phù hợp với nghiên cứu trước [3].

5. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã chứng minh xét nghiệm so màu LAMP có độ nhạy phát hiện như xét nghiệm qPCR (khuyến nghị trong việc phát hiện MPV). Không giống như qPCR, LAMP có nhiều ưu điểm như khả năng làm việc trực tiếp trên các mẫu lâm sàng thô mà không cần đến bước chiết xuất DNA, thời gian thực hiện phản ứng ngắn, điều kiện đẳng nhiệt, kết quả có thể quan sát trực tiếp bằng mắt thường và không đòi hỏi thiết bị chuyên dụng đắt tiền. Do đó, phát triển xét nghiệm so màu MPV LAMP là một phương pháp thay thế có độ đặc hiệu cao, nhạy, nhanh và đơn giản hơn so với qPCR trong phát hiện chính xác và nhanh chóng MPV tại hiện trường với các phương tiện xét nghiệm hạn chế.

Trong tương lai, để ứng dụng phản ứng LAMP vào chẩn đoán MPV tại thực địa, cần có thêm các

nghiên cứu khác đánh giá về mức độ hiệu quả của nhiều bộ môi khác nhau trên các trình tự mục tiêu khác nhau, nhằm lựa chọn bộ môi cho khả năng hoạt động tốt nhất. Bên cạnh đó, cần tiến hành các thử nghiệm sâu hơn trên những mẫu lâm sàng thực tế, qua đó, đưa ra các kiến nghị điều chỉnh quy trình lấy mẫu và đưa ra một quy trình thực hiện xét nghiệm chuẩn xác và tối ưu. Mặt khác, việc thương mại hóa kit LAMP so màu MPV cần có các nghiên cứu đánh giá thêm về hiệu suất của xét nghiệm LAMP trong thời gian dài cũng như điều kiện bảo quản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Feng J, Xue G, Cui X, et al (2022), "Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid and visual detection of monkeypox virus", *Microbiology spectrum*, 10 (5): e02714-22.
2. NEB (2023), "FAQs: Can Bst DNA Polymerase be used at temperatures other than 65°C?", 2023. <https://www.neb.com/en/faqs/2011/12/17/can-bst-dna-polymerase-be-used-at-temperatures-other-than-65-176-c>.
3. Feng J, Xue G, Cui X, et al (2022), "Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid and visual detection of monkeypox virus", *Microbiology spectrum*, 2022, 10 (5): e02714-22.
4. James HE, Ebert K, McGonigle R, et al (2010), "Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification", *Journal of virological methods*, 2010,164 (1-2): 68-74.
5. Atuhaire DK, Afayoa M, Katiti D, et al (2014), *Comparative detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification assay and polymerase chain reaction in domestic pigs in Uganda*, 2014.
6. Tanner NA, Zhang Y, Evans Jr TC (2015), "Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes", *Biotechniques*, 2015, 58 (2): 59-68. □