

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT PCR 16S rDNA PHÁT HIỆN NHANH VI KHUẨN LAO VÀ PHỐI HỢP KỸ THUẬT NESTED PCR IS6110 XÁC ĐỊNH CHỦNG VI KHUẨN LAO MẤT ĐOẠN IS6110 TỪ CÁC MẪU BỆNH PHẨM

Nguyễn Thị Châu Anh¹, Nguyễn Hoàng Bách¹, Huỳnh Hải Đường¹, Lê Nữ Xuân Thanh¹, Lê Xuân Cường², Lê Văn Đức³, Bảo Thuyết³, Ngô Việt Quỳnh Trâm¹, Piero Cappuccinelli¹

(1) Trung tâm Carlo Urbani - Bộ môn Vi sinh - Trường Đại học Y Dược Huế,

(2) Khoa Lao - Bệnh viện Trung ương Huế,

(3) Bệnh viện Lao và Bệnh phổi Đà Nẵng

Tóm tắt:

Đặt vấn đề: Kỹ thuật Nested PCR phát hiện đoạn gen IS6110 thường được sử dụng để chẩn đoán lao, nhưng có thể cho kết quả âm tính giả do một số chủng vi khuẩn lao không có đoạn IS6110. Đoạn gen mã hóa ribosom 16S (16S rDNA) luôn có các đoạn gen ngắn đặc hiệu cho vi khuẩn gây bệnh lao. **Mục tiêu:** Sử dụng kỹ thuật Realtime 16S rDNA PCR để phát hiện vi khuẩn lao và phối hợp với kỹ thuật Nested IS6110 PCR để xác định tỷ lệ chủng vi khuẩn lao mất đoạn IS6110 từ các mẫu bệnh phẩm khác nhau. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Thực hiện kỹ thuật Realtime của Công ty Việt Á cho 480 mẫu bệnh phẩm các loại và Nested IS6110 PCR với bộ kit tự pha chế cho các mẫu dương tính với 16S rDNA PCR. **Kết quả:** Kỹ thuật 16S rDNA PCR phát hiện 258 (53,8%) trường hợp lao. Có 3 chủng vi khuẩn lao (1,2%) không có đoạn IS6110 trong bộ gen. **Kết luận:** Kỹ thuật Nested IS6110 PCR rẻ và dễ sử dụng rộng rãi hơn 16S rDNA Realtime PCR, tuy nhiên cho kết âm tính giả với tỷ lệ thấp (1,2%). Phối hợp hai kỹ thuật PCR trên có thể phát hiện chủng vi khuẩn mất đoạn IS6110.

Abstract:

DETECTING MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RAPIDLY AND MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS STRAINS WITHOUT IS6110 SEQUENCE BY PCR ASSAY

Nguyen Thi Chau Anh¹, Nguyen Hoang Bach¹, Huynh Hai Duong¹, Le Nu Xuan Thanh¹, Le Xuan Cuong², Le Van Duc³, Bao Thuyet³, Ngo Viet Quynh Tram¹, Piero Cappuccinelli¹

(1) Carlo Urbani Centre - Hue University of Medicine and Pharmacy

(2) Dept. of Tuberculosis - Hue Central Hospital

(3) Danang Hospital of Tuberculosis and Lung Disease

Background: The Nested IS6110 PCR is used for detecting tuberculosis, however IS6110 sequence is not present in the genome of all strains of *M. tuberculosis*, the result may be false negative. The gene coding 16S ribosome always contains a short sequence specific to *M. tuberculosis* complex. **Objects:** Performance of the 16S Real-time PCR to detect *M. tuberculosis* and combining to the nested IS6110 PCR to determine the rate of *Mtb* strains without IS6110 from clinical samples. **Materials and method:** Performance of 16S rDNA PCR by commercial kit of Viet A Inc. for all 480 samples, the samples which were positive with the 16S rDNA PCR

were retested in IS6110 PCR assay by in-house kit. Results: The Realtime 16S rDNA PCR detected 258 cases (53.8%) of tuberculosis. There were 3 (1.2 %) *M. tuberculosis* strains which do not harbor IS6110 sequence in genome. Conclusion: The IS6110 nested PCR can be applied more widely than the 16S rDNA realtime PCR. In case of using IS6110 PCR assay, results may show a low proportion of false negative. Combining 16S rDNA PCR with the IS6110 based PCR allowed detection of deletion of IS6110 sequence in *M. tuberculosis* isolates.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh lao vẫn luôn là một vấn đề sức khỏe cộng đồng nghiêm trọng, dẫn đến nguy cơ lan truyền bệnh làm gia tăng tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong^[6]. Các phương pháp thông thường để phát hiện vi khuẩn lao bao gồm nhuộm Ziehl-Neelsen, nhuộm huỳnh quang auramine và nuôi cấy^[2]. Tuy nhiên, các kỹ thuật nhuộm có độ nhạy phát hiện không cao và độ đặc hiệu thấp, trong khi đó nuôi cấy cho kết quả chính xác nhưng lại chậm.

Kỹ thuật khuếch đại gen (PCR) là kỹ thuật nhanh, nhạy và đặc hiệu phát hiện vi khuẩn lao từ môi trường lòng nuôi cấy lao^[11] và từ bệnh phẩm^[10]. Đoạn gen chèn IS6110 được lặp lại từ 4-20 lần trong bộ gen của hơn 95% các chủng vi khuẩn lao, nên thường được chọn trong kỹ thuật PCR phát hiện vi khuẩn lao vì làm tăng độ nhạy phát hiện^[8]. Thực hiện kỹ thuật nested PCR với đoạn gen đích IS6110 càng làm cho độ nhạy phát hiện tăng cao hơn. Tuy nhiên, một nghiên cứu của Yuen tại Úc^[12] cho đoạn IS6110 không phải luôn có trong tất cả các chủng vi khuẩn lao ở nhóm bệnh nhân người Việt Nam, vì vậy kỹ thuật PCR IS6110 có thể cho kết quả âm tính giả. Trong khi đó, đoạn gen mã hóa ribosom 16S (16S rDNA) - đặc hiệu chung cho các vi khuẩn kháng acid cồn, nhưng bên trong có chứa đoạn gen ngắn đặc hiệu cho các vi khuẩn gây bệnh lao - luôn có trong bộ gen của vi khuẩn lao, nên thường được dùng nhiều nhất trong kỹ thuật realtime PCR phát hiện vi khuẩn lao^[8].

Với những lý do trên, chúng tôi sử dụng kỹ thuật realtime PCR 16S rDNA để phát hiện nhanh vi khuẩn lao và phối hợp với kỹ thuật nested PCR IS6110 để xác định tỷ lệ chủng vi

khẩn lao mất đoạn IS6110 từ các mẫu bệnh phẩm khác nhau.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1.1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm 480 mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân nghi ngờ lao đến khám tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế, Khoa lao Bệnh viện Trung ương Huế và Bệnh viện Phổi Đà Nẵng.

1.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Trung tâm Carlo Urbani, Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y Dược Huế, thời gian từ 07/2009 đến 06/2011.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp mô tả cắt ngang.

2.4. Vật liệu nghiên cứu

2.4.1. Môi trường, hóa chất:

- NaOH 4%, PBS 1X dùng để xử lý đàm.
- Bộ kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) để tách chiết DNA.
- Bộ kit realtime PCR định tính phát hiện vi khuẩn lao trên đoạn gen đích là 16S theo phương pháp Taq Man (công ty Việt Á).
- PCR Mastermix (2X), dung dịch tải loading và thang chuẩn DNA vạch 100bp (đôi base) của Fermentas, dung dịch điện di TBE (BioRad), agarose (BioRad), ethidium bromide (Merk).
- Hai cặp gen môi IS1, IS2 và IS3, IS4 của đoạn gen IS6110 đặc hiệu cho vi khuẩn lao của hãng IDT

2.4.2. Dụng cụ và phương tiện:

- Ống quay ly tâm 50ml và tube eppendorf 1,5ml, tube PCR 0,2ml, pipette Pasteur 3ml, bộ micropipette và các đầu micropipette có

lọc với các thể tích khác nhau.

- Máy quay ly tâm, siêu ly tâm 13000 vòng/phút và máy ủ nhiệt hãng Eppendorf, máy PCR hãng ABI, máy real time PCR Stratagene Mx 3000 (Mỹ) và hệ thống máy vi tính, buồng điện di ngang (BioRad), buồng đọc UV (UVP).

1.5. Tiến hành

- Xử lý bệnh phẩm bằng NaOH 4% (trừ mẫu bệnh phẩm là dịch não tủy), ủ 95°C/20 phút để giết chết vi khuẩn.
- Tách chiết DNA từ mẫu đàm theo quy trình của QiaGen.
- Thực hiện kỹ thuật nested PCR 2 bước: chương trình 1: 94°C/3 phút, (94°C/50 giây, 58°C/50 giây, 72°C/50 giây) x 36 chu kỳ, 72°C/5 phút; chương trình 2: 94°C/3 phút, (94°C/50 giây, 60°C/50 giây, 72°C/50 giây) x 36 chu kỳ, 72°C/5 phút. Điện di sản phẩm PCR trên thạch agarose 2% cùng với thang chuẩn DNA vạch 100bp, nhuộm ethidium bromide, soi trong buồng UV, sản phẩm PCR đặc hiệu có chiều dài 300bp.
- Thực hiện kỹ thuật Real time PCR định tính theo quy trình của Công ty Việt Á.
- Phân tích và xử lý kết quả.

3. KẾT QUẢ

Thực hiện kỹ thuật 16S rDNA phát hiện vi khuẩn lao cho 480 mẫu bệnh phẩm bao gồm đàm, dịch rửa phế quản, dịch màng phổi,

dịch não tủy, và các mẫu khác như dịch dạ dày, dịch khớp, máu, mũ abscess. Mẫu đàm chiếm đa số 76%. Nhuộm Ziehl Neelsen, có 192 (40%) mẫu bệnh phẩm các loại cho kết quả AFB dương tính, không có mẫu dịch não tủy nào dương tính. Trong số các mẫu đàm có khoảng 50% (186/365) dương tính với AFB; tỷ lệ dương tính thấp hơn ở các mẫu khác (dịch phế quản: 1/30 – 3,3%), dịch màng phổi (2/50-4%) và các loại khác (3/25-12%) (Bảng 1).

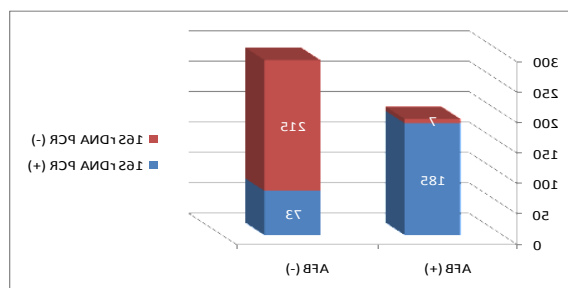
Bảng 1. Tỷ lệ AFB dương tính

Bệnh phẩm			AFB dương tính	
	n	%	n	%
Đàm	365	76,0	186	50,9
Dịch phế quản	30	6,3	1	3,3
Dịch màng phổi	50	10,4	2	4,0
Dịch não tủy	10	2,1	0	-
Khác	25	5,2	3	12,0
Tổng cộng	480	100	192	40,0

Thực hiện kỹ thuật Realtime 16S rDNA PCR cho 480 mẫu bệnh phẩm phát hiện 258 trường hợp dương tính với lao (53,8%). Có 3,6% (7/192) trường hợp AFB dương tính nhưng âm tính với kỹ thuật 16S rDNA PCR. Ngoài ra, kỹ thuật 16S rDNA PCR còn phát hiện thêm 73 trường hợp nhiễm lao từ các mẫu AFB âm tính (trong đó 54 mẫu đàm (30,2%) và 19 (17,4%) từ bệnh phẩm là các chất dịch khác như dịch não tủy, dịch màng phổi, dịch rửa phế quản (Bảng 2 và Hình 1).

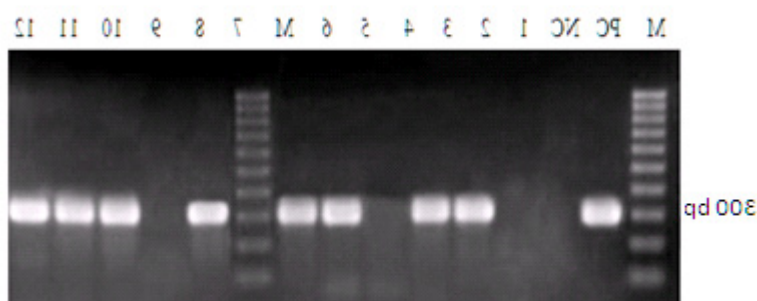
Bảng 2. Tỷ lệ realtime 16S rDNA PCR dương tính theo AFB

16S rDNA PCR		AFB	
		Dương tính	Âm tính
	n (%)	n (%)	n (%)
Đàm	365 (100%)	186 (100%)	179 (100%)
Dương tính	233 (63,8%)	179 (96,2%)	54 (30,2%)
Âm tính	132 (36,2%)	7 (3,8%)	125 (69,8%)
Các chất dịch khác	115 (100%)	6 (100%)	109 (100%)
Dương tính	25 (21,3%)	6 (100%)	19 (17,4%)
Âm tính	90 (78,7%)	0 -	90 (82,6%)
Tổng cộng	480 (100%)	192 (100%)	288 (100%)
Dương tính	258 (53,8%)	185 (96,4%)	73 (25,3%)
Âm tính	222 (46,2%)	7 (3,6%)	215 (74,7%)



Hình 1. Tỷ lệ realtime PCR 16S theo AFB

Thực hiện kỹ thuật nested IS6110 PCR đối với 258 mẫu dương tính với kỹ thuật realtime 16S rDNA PCR cho thấy có 255 (98,8%) mẫu dương tính với IS6110, có 3 mẫu (1,2%) là âm tính với IS6110 (Hình 2 và Bảng 3).



Hình 2. Kết quả điện di trên thạch agarose 2%, M: Thước DNA 100 bp, PC: Chứng dương (H37Rv) có sản phẩm PCR 300 bp, NC: Chứng âm, 1-12: mẫu bệnh nhân

Bảng 3. Tỷ lệ IS6110 âm tính trong số các mẫu dương tính với 16S rDNA PCR

IS6110 PCR	16S rDNA PCR (+)	
	n	%
Dương tính	255	98,8
Âm tính	3	1,2
Tổng cộng	258	100

4. BÀN LUẬN

Quy trình thực hiện kỹ thuật PCR chẩn đoán lao bao gồm xử lý mẫu nghiệm, tách chiết DNA, chuẩn bị dung dịch phản ứng, thực hiện quá trình khuếch đại trong máy luân nhiệt và phân tích kết quả mất khoảng thời gian hơn 1 ngày, như vậy có thể cho kết quả nhanh trong vòng 2 ngày, trong khi kết quả nuôi cấy bằng máy tự động là 13 ngày và cấy trên môi trường Lowenstein Jensen là 26 ngày^[7].

Thực hiện kỹ thuật Realtime PCR 16S cho 480 mẫu bệnh phẩm khác nhau ta thấy có 258 trường hợp (53,8%) dương tính, trong đó 185 trường hợp từ các mẫu AFB dương tính (96,4%) và 73 trường hợp từ các mẫu AFB

âm tính (25,3%). Đặc biệt kỹ thuật PCR 16S rDNA đã phát hiện được 19 (17,4%) trường hợp lao trong 109 mẫu bệnh phẩm là các loại dịch nhưng AFB âm tính.

Theo Kent và cộng sự, AFB âm tính có thể do 2 khả năng, hoặc đó không phải là *Mtc*, hoặc là *Mtc* nhưng số lượng vi khuẩn ít hơn 5×10^3 đến 5×10^4 /ml bệnh phẩm^[5]. Theo Thoe và cộng sự, độ nhạy cảm của kỹ thuật nested PCR IS6110 và AFB theo thứ tự là 83,8% và 56,8%^[9]. Theo các nghiên cứu trước đây, các kỹ thuật PCR khác cho kết quả dương tính tới 95-100% các mẫu bệnh phẩm dương tính với AFB hay nuôi cấy và 40-60% ở các bệnh phổi

nhưng AFB âm tính; kỹ thuật PCR có thể cho kết quả dương tính khi trong bệnh phẩm có từ 1-10 vi khuẩn lao^[4].

Kỹ thuật Realtime PCR 16S dùng cặp gen mới đặc hiệu cho mycobacteria và đầu dò (probe) đặc hiệu cho vi khuẩn lao và luôn tồn tại ở tất cả các chủng vi khuẩn lao, do đó tất cả 258 mẫu dương tính với kỹ thuật PCR 16S đều nhiễm lao; 73 mẫu âm tính với AFB nhưng dương tính với PCR cho thấy vai trò quan trọng trong việc chẩn đoán sớm đối với các trường hợp bệnh phẩm quá ít trực khuẩn lao, không thể phát hiện bằng phương pháp nhuộm tìm AFB. Ngoài ra, kỹ thuật Realtime PCR 16S còn phát hiện được 7 trường hợp trong 192 mẫu AFB dương tính không phải là trực khuẩn lao.

Nghiên cứu của Yuen^[12] tại Úc cho thấy một số chủng vi khuẩn lao (4 trong số 41 bệnh nhân) phân lập được từ bệnh nhân người Việt Nam mất đoạn IS6110. Thực hiện kỹ thuật PCR IS6110 trên các mẫu dương tính với

PCR 16S rDNA cho thấy hầu hết các mẫu đều dương tính (98,8%), chỉ có 3 mẫu (1,2%) âm tính - Do đây là chủng vi khuẩn lao mất đoạn IS6110. Như vậy, nếu sử dụng kỹ thuật PCR phát hiện lao dựa trên đoạn gen đích IS6110 có thể bỏ sót trường hợp bệnh nhân nhiễm chủng vi khuẩn lao không có đoạn IS6110, vì sẽ cho kết quả âm tính giả.

5. KẾT LUẬN

Kỹ thuật PCR chẩn đoán lao từ các bệnh phẩm lâm sàng cho kết quả nhanh trong vòng 2 ngày. Kỹ thuật Realtime PCR 16S rDNA phát hiện 53,8% trường hợp lao, trong đó có 25,3% trường hợp từ các mẫu bệnh phẩm AFB âm tính.

Kỹ thuật nested IS6110 PCR được thực hiện với bộ kit tự pha chế và sử dụng máy luân nhiệt thông thường nên rẻ và dễ sử dụng rộng rãi, tuy nhiên có thể cho kết quả âm tính giả với tỷ lệ thấp (1,2%) trong trường hợp nhiễm chủng vi khuẩn lao mất đoạn IS6110.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Buck GE, O'Hara LC, Summersgill JT. 1992. Rapid, simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:1331-1334.
2. Chien HP, Yu MC, Wu MH, Lin TP, Luh KT. 2000. Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Lowenstein Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4. 866-870.
3. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. 1990. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 161:977-81.
4. Katoch VM. 2003. Advances in Molecular Diagnosis of Tuberculosis. *MJAFI.* 59:82-86.
5. Kent PT & Kubica GP. 1985. Public Health Mycobacteriology: a Guide for the level III Laboratory. Centers for Disease Control, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta.
6. Martin G, Lazarus A. 2000. Epidemiology and diagnosis of tuberculosis. Recognition of at-risk patients is key to prompt detection. *Postgrad. Med.* 108: 42-44, 47-50, 53-54.
7. Moore D, Gilman R, Evans C, et al.. 2006. Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for the Diagnosis of TB. *N Engl J Med.* 355: 1539-50.
8. Palomino, Leão, Ritacco. 2007. Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care *TuberculosisTextbook.com*. First Edition.
9. S.Y.Se Thoe, L.Tay and E.H.Sng (1997), "Evaluation of Amplicor-and IS6110 for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Singapore", *Tropical Medicine and International Health*, Vol 2, No II, p.1095-1101.
10. Scarparo C, Piccoli P, Rigon G, Ruggiero A, Nista D, Piersimoni C. 2001. Direct identification of mycobacteria from MB/BacT Alert 3D bottles: comparative evaluation of two commercial probe assays. *J. Clin. Microbiol.* 39:3222-3227.
11. Telenti M, de Quiros JF, Alvarez M, Santos Rionda MJ, Mendoza MC. 1994. The diagnostic usefulness of a DNA probe for *Mycobacterium tuberculosis* complex (Gen-Probe) in Bactec cultures versus other diagnostic methods. *Infection* 22:18-23.
12. Yuen LK, Ross BC, Jackson KM, Dwyer B. 1993. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1615-1618.