

HOÀN THIỆN QUY TRÌNH PCR ĐỐI VỚI HAI GEN MỚI IS1081 VÀ 23SrADN TRONG NÂNG CAO HIỆU QUẢ CHẨN ĐOÁN LAO

*Nguyễn Thái Sơn**

*Hoàng Văn Tổng**

Bùi Tiến Sỹ và CS*

TÓM TẮT

Ứng dụng sinh học phân tử trong chẩn đoán lao cho phép chẩn đoán nhanh vi khuẩn lao từ các mẫu bệnh phẩm lâm sàng và xác định chính xác vi khuẩn lao chỉ trong hai ngày. Kết quả nghiên cứu bước đầu của chúng tôi với cả ba gen đích từ các chủng vi khuẩn lao ở Việt Nam cho thấy: tỷ lệ khuyết gen *IS6110*, *IS1081*, *23S rDNA* ở các chủng lâm sàng tương ứng là 8%, 26,3%, 10,5%. Sử dụng PCR với một gen đích không đủ cho chẩn đoán các chủng vi khuẩn gây bệnh lao ở Việt Nam. Multiplex PCR với cả ba gen đích đồng thời (*IS6110*, *IS1081*, *23S rADN*) giúp tăng cường chẩn đoán, tránh bỏ sót các chủng vi khuẩn lao gây bệnh.

*Từ khoá: Chẩn đoán phân tử; Bệnh lao; PCR; Multiplex PCR.

IMPROVEMENT OF PCR AMPLIFICATION TWO GENES IS1081 AND 23rDNA IN DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

Nguyen Thai Son

Hoang Van Tong

Bui Tien Sy et al

SUMMARY

Molecular diagnostics in tuberculosis have enabled rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex (MBTC) in clinical specimens and identification of Mycobacteria species within 2 days. In our pilot study with 3 primer pairs for 3 target genes (IS6110, IS1081, 23S rDNA), the results show that: The rates of lack of IS 6110, IS 1081, 23S rDNA in the clinical strains are 8%, 26,3%, 10.5% respectively. PCR amplification one target gene is insufficient for MBTC diagnosis in Vietnam. Multiplex PCR for 3 target genes simultaneously (IS6110, IS1081, 23S rDNA) can detect all MBTC.

**Key words: Molecular diagnostics; Tuberculosis; PCR; Multiplex PCR.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự trở dậy của bệnh lao đang là một vấn đề sức khỏe nghiêm trọng của toàn thế giới, *Mycobacterium tuberculosis (M. t)* hiện đã lây nhiễm 1/3 dân số thế giới. Hàng năm có thêm khoảng 8 triệu người mắc lao mới và khoảng 2 triệu người chết do lao.

PCR đã được chứng minh là công cụ rất hữu ích trong chẩn đoán nhanh các bệnh truyền nhiễm. Một số xét nghiệm bằng PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu loài cho phép phát hiện một chủng *Mycobacteria*. [2]. Tuy nhiên một số nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng các chủng *M.tb* không mang trình tự IS6110, đặc biệt

* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: GS.TS. Lê Bách Quang

các chủng phân lập được từ Đông Nam Á. và Ấn Độ. Do đó có thể gây ra hiện tượng âm tính giả trong chẩn đoán. Hiện nay ở Việt Nam vẫn chưa có nghiên cứu nào về xét nghiệm phát hiện vi khuẩn lao bằng kỹ thuật PCR dựa trên 2 gen mới, do đó chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhằm:

1. Hoàn thiện quy trình PCR đối với hai gen mới IS1081 và 23S rDNA trong chẩn đoán lao.

2. Đánh giá khả năng ứng dụng kỹ thuật PCR với hai gen đích IS1081, 23S rDNA trên các bệnh phẩm lâm sàng.

ĐỐI T- ỌNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

40 chủng vi khuẩn lao gây bệnh (MBTC) do Viện Lao và Bệnh phổi trung ương cung cấp được sử dụng để tạo panel mẫu chuẩn ADN trong phản ứng PCR chẩn đoán lao.

Các mẫu bệnh phẩm lâm sàng của các bệnh nhân (BN) nghi lao được thu thập tại các khoa của Bệnh viện 103 - Học viện Quân y (khoảng từ 10 đến 20 ml). Trong đó, các loại bệnh phẩm gồm dịch màng phổi, dịch rửa phế quản, đờm, dịch màng bụng, dịch màng tim, dịch khớp, dịch não tủy, nước tiểu, sinh thiết...

2. Vật liệu nghiên cứu.

Hoá chất và các trang thiết bị được sử dụng tại Phòng Vi sinh vật và mầm bệnh sinh học - Trung tâm nghiên cứu Sinh Y Dược học - Học viện Quân y.

Các cặp mồi đặc hiệu cho các gen đích IS6110, IS1081, 23S rADN có trình tự tương ứng là (IS 6110F: 5' CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC 3', IS 6110R: 5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA 3'), (IS 1081L: 5' TCG CGT GAT CCT TCG AAA CG 3' IS 1081R: 5' GCC GTT GCG CTG ATT GGA CC 3'), (23Sf2: 5' GAA AAC AAT TGT GAT TCC GCA AG 3' 23Sr1: 5' CGG GTA GCG CTG AGA CAT ATC CT 3') được thiết kế và đặt tổng hợp tại hãng Invitrogen [1, 2].

3. Phương pháp nghiên cứu.

3.1. Phương pháp tách chiết và tinh sạch ADN:

Các chủng vi khuẩn lao sử dụng làm panel chuẩn và các loại bệnh phẩm khác nhau được xử lý để đảm bảo an toàn sinh học và ly tâm thu tế bào vi khuẩn. Tế bào thu được sau đó được ly giải bằng Lysis buffer có thành phần là Tris-HCl 1M (pH 8,5), EDTA 0,5M, SDS 10%, NaCl 5M với sự có mặt của lysozyme 25mg/ml (ủ trong đá 30 phút) sau đó tiếp tục ủ lắ ở 56⁰C trong 2 đến 3 giờ với sự có mặt của proteinase K 10 mg/ml. Dung dịch ly giải được chiết bằng hỗn hợp phenol: chloroform: isoamyl-alcohol (25:24:1). Tủa ADN bằng cồn 100% sau đó ly tâm 14000 v/p/20 phút ở 4⁰C và rửa bằng cồn 70%. Hoà tan ADN thu được sau khi làm khô trong 100µl nước khử ion vô trùng.

3.2. Phương pháp tạo panel mẫu:

ADN tách chiết từ các chủng *M. tuberculosis* được sử dụng để chạy phản ứng PCR nhân từng gen đích IS6110, IS1081, 23S rDNA bằng quy trình cơ bản của phản ứng PCR. Mẫu lao nào có xuất hiện băng đặc hiệu cho từng gen đích được sử dụng làm mẫu chuẩn cho quá trình tối ưu hoá phản ứng PCR và đánh giá kết quả tối ưu. Các mẫu chuẩn âm tính là các mẫu ADN tách chiết từ *E. coli*.

3.3. Phương pháp nhân các gen đích bằng kỹ thuật PCR:

Phản ứng PCR thực hiện trên máy GeneAmp PCR System 9700 và ICycler. Tối ưu hoá các thành phần của phản ứng PCR, tối ưu hoá nồng độ $MgCl_2$ bằng cách chạy gradient nồng độ Mg^{++} 1mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM và 4.0mM. Tối ưu hoá chu trình nhiệt bằng cách chạy gradient nhiệt độ gắn môi, nhiệt độ trung gian được chia tự động trên máy ICycler từ 54⁰C đến 68⁰C. Số chu kỳ phản ứng áp dụng là 40. Tối ưu thời gian biến tính, thời gian gắn môi và thời gian kéo dài chuỗi dựa trên chu trình nhiệt cơ bản đã có của phản ứng PCR.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả tối ưu hoá quy trình phản ứng PCR.

Lựa chọn nhiệt độ gắn môi, sử dụng chương trình Gradient nhiệt của máy ICycler trong khoảng nhiệt độ nóng chảy của môi từ 54⁰C đến 68⁰C. Sử dụng mẫu panel chuẩn dương tính với ADN của vi khuẩn lao, chuẩn bị 16 phản ứng PCR giống nhau về thành phần (8 phản ứng cho IS1081, 8 phản ứng cho gen 23S rDNA tương ứng với các mốc nhiệt độ trên), chạy đồng thời trong cùng một điều kiện chỉ khác nhau về nhiệt độ gắn môi. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% và hình ảnh điện di được chụp bằng máy Dolphin - DOC. Kết quả cho thấy băng ADN của gen đích *IS1081* rõ nhất ở vị trí số 4, tương ứng với nhiệt độ 58,6⁰C; còn băng ADN của gen đích *23S rDNA* rõ nhất ở vị trí số 5, tương ứng với nhiệt độ 61,7⁰C.

Đối với thời gian gắn môi, chuẩn bị 8 phản ứng PCR trên các panel chuẩn giống hệt nhau về thành phần ứng với mốc thời gian 30-45-60-90 giây, chạy đồng thời trong cùng một điều kiện, và cùng một nhiệt độ gắn môi đã tối ưu ở trên (58,6⁰C cho 4 phản ứng với gen đích *IS1081*; 61,7⁰C cho 4 phản ứng với gen đích

23S rDNA) chỉ khác nhau về thời gian duy trì nhiệt độ gắn môi. Kết quả cho thấy đậm độ các băng ADN của gen đích *IS1081* cao nhất ở vị trí số 2, tương ứng với thời gian gắn môi là 45s, với gen đích *23S rDNA* thì đậm độ cao nhất cũng ở vị trí số 2 tương ứng với thời gian gắn môi là 45s.

Hình 2: Ảnh điện di gradient thời gian gắn môi của hai gen đích *IS1081* và *23S rDNA*.

Đối với nồng độ Mg^{++} kết quả cho thấy đậm độ băng ADN rõ nhất đối với gene IS1081 là vị trí số 3 tương ứng với nồng độ Mg^{++} 2.5mM, còn đối với gene 23S rDNA là vị trí số 4 tương ứng với nồng độ Mg^{++} 3.0mM.

2. Kết quả chạy kiểm tra trên panel mẫu chuẩn.

Sau khi tìm được qui trình PCR thích hợp với hai gen đích mới như nêu trên, tiến hành chạy thử trên các panel mẫu chuẩn của vi khuẩn lao cùng với bộ kit PCR sử dụng primer cho gen đích *IS6110* đang được sử dụng. Chúng tiến hành chạy PCR trên 24 panel mẫu chuẩn dương tính với các gen đích và 12 panel mẫu chuẩn âm tính với các gen đích. Kết quả cho thấy, cả hai primer cho gen đích mới và primer cho *IS 6110* đều cho độ nhạy và độ đặc hiệu 100% với panel mẫu chuẩn của vi khuẩn lao.

Bảng 1: Kết quả chạy thử trên panel mẫu chuẩn của vi khuẩn (VK) lao với cặp primer cho gen đích IS 1081, 23S rDNA, và IS 6110.

		PANEL MẪU CHUẨN VK LAO		TỔNG
		+	-	
IS1081	+	24	0	24
23S RDNA	-	0	12	12
IS6110				
Tổng		24	12	36

Độ nhạy (Se) = $24/24 \times (100\%) = 100\%$.

Độ đặc hiệu (Sp) = $12/12 \times (100\%) = 100\%$.

3. Kết quả PCR chẩn đoán lao trên các bệnh phẩm lâm sàng.

Bảng 2: Kết quả PCR chẩn đoán lao trên các bệnh phẩm lâm sàng sử dụng 3 cặp primer đồng thời.

GEN ĐÍCH	SỐ MẪU (+)	KẾT QUẢ PCR CỦA TỪNG CẶP PRIMER	
		Dương tính (%)	Âm tính (%)
IS6110	25	23 (92%)	2 (08%)
23Sr	19	17 (89,5%)	2 (10,5%)
IS1081	19	14 (73,7%)	5 (26,3%)

BÀN LUẬN

1. Tối ưu thành phần và chu trình nhiệt cho phản ứng PCR.

Trên ảnh điện di 1 cho thấy đậm độ các băng ADN của gen đích *IS1081* cao nhất ở vị trí số 4, tương ứng với nhiệt độ $58,6^{\circ}\text{C}$ còn đậm độ các băng ADN của gen đích *23Sr* DNA cao nhất ở vị trí số 5, tương ứng với nhiệt độ $61,7^{\circ}\text{C}$. Qua đó cho thấy nhiệt độ gần mỗi tốt nhất với

gen đích *23SrDNA* là $61,7^{\circ}\text{C}$, nhiệt độ gắn môi tốt nhất cho gen đích *IS1081* là $58,6^{\circ}\text{C}$. Và chúng tôi sử dụng các nhiệt độ này cho các phản ứng sau.

Thời gian duy trì nhiệt độ gắn môi thông thường với các primer có độ dài từ 18 đến 40 bp trong khoảng 20 giây đến 90 giây, ngoài ra thời gian này còn phụ thuộc tỉ lệ % G, C trên tổng số các nucleotide trong toàn bộ trình tự primer. Hình 2 cho thấy đậm độ các băng ADN của gen đích *IS1081* trên ảnh điện di cao nhất ở vị trí số 2, tương ứng với thời gian duy trì nhiệt độ gắn môi là 45s, còn với gen đích *23S rDNA* thì đậm độ cao nhất ở vị trí số 2 tương ứng với thời gian gắn môi là 45s và chúng tôi chọn thời gian này cho các lần chạy sau.

Ion Mg^{++} là điều kiện thiết yếu cho hoạt động của Taq ADN polymerase, ngoài ra nó còn cần cho cả hoạt động của dNTPs, ADN khuôn và môi. Ảnh điện di cho thấy đậm độ băng ADN rõ nhất đối với gene *IS1081* là ở vị trí số 3 tương ứng với nồng độ Mg^{++} 2,5mM, còn đối với gene *23S rDNA* là ở vị trí số 4 tương ứng với nồng độ Mg^{++} 3,0mM. Ở các nồng độ quá cao và quá thấp thu được băng không rõ nét, điều này hoàn toàn có thể lý giải được là do nồng độ Mg^{++} quá thấp nhóm phosphate ở dNTPs, ADN môi và ADN khuôn đã liên kết ion này làm cho Taq ADN polymerase không có chất xúc tác nên không thực hiện được chức năng. Tuy nhiên nồng độ Mg^{++} quá cao thì có thể gây ra hiện tượng ức chế hoạt tính của enzyme Taq ADN polymerase do đó băng ADN thu được có đậm độ không cao.

2. Đánh giá kết quả tối ưu phản ứng PCR trên panel chuẩn và khả năng ứng dụng trong chẩn đoán lao trên bệnh phẩm lâm sàng.

Kết quả cho thấy cả 3 cặp primer cho 3 gen đích dùng chẩn đoán VK lao chạy thử nghiệm trên panel mẫu chuẩn đều có khả năng phát hiện với độ nhạy và độ đặc hiệu 100%, hoàn toàn có thể ứng dụng chẩn đoán tìm VK lao trong các mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

3. Ứng dụng phản ứng PCR trong chẩn đoán tìm VK lao trong các mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

Mẫu dương tính là những mẫu đã được khẳng định có vi khuẩn lao với ít nhất một trong các gen đặc trưng của vi khuẩn lao đã được xác định. Trong những mẫu này, tiến hành chạy đồng thời 3 phản ứng PCR với 3 cặp primer cho 3 gen đích khác nhau. Căn cứ trên các số liệu mà chúng tôi thu thập được thì hoàn toàn trùng với những công bố trước đây về những chủng VK lao khuyết gen *IS6110* ở khu vực Đông Nam châu Á, trong đó có Việt Nam [5, 6]. Các nghiên cứu trước cho biết tỷ lệ khuyết gen *IS6110* ở khu vực Đông Nam châu Á khoảng 5-8%, số liệu ban đầu của chúng tôi cho thấy tỷ lệ khuyết *IS6110* ở các chủng lâm sàng trong nước là 8%. Chúng tôi còn phát hiện một vấn đề nữa mà chưa thấy các tác giả gợi ý sử dụng *23S rDNA* và *IS1081* trong chẩn đoán lao đề cập đến, đó là tỷ lệ khuyết *23S rDNA* và khuyết *IS1081*. Kết quả sơ bộ cho thấy tỷ lệ khuyết *23S rDNA* là 10,5% và khuyết *IS1081* là 26,3%. Đây đều là những gen đặc trưng của VK lao nhưng không phải tất cả các chủng VK lao đều mang đầy đủ 3 gen này, có một tỷ lệ nhất định các chủng khuyết một hoặc hai trong ba gen trên. Như vậy không thể sử dụng một trong các gen đích *IS1081*, *23S rDNA* thay thế cho *IS6110* trong chẩn đoán lao như các tác giả trên thế giới gợi ý, có thể đây là đặc điểm riêng của những chủng lao ở Việt Nam và khu vực. Vấn đề này cần tiếp tục nghiên cứu và công bố trong thời gian tới. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy cần phải kết hợp cả 3 gen đích cho phản ứng PCR để tránh các trường hợp khuyết gen.

KẾT LUẬN

Hai cặp primer cho hai gen đích mới được ứng dụng cho phản ứng PCR chẩn đoán lao có giá trị ứng dụng cao. Đối với gen đích IS1081, qui trình thích hợp là: 95⁰C: 5 phút (94⁰C: 1 phút, 58,6⁰C: 45 giây, 72⁰C: 1 phút) x 40 chu kỳ, 72⁰C: 10 phút, và giữ ở 4⁰C. Còn với gen đích 23S rDNA là 95⁰C: 5 phút (94⁰C:1 phút, 61,7⁰C: 45 giây, 72⁰C: 1 phút) x 40 chu kỳ, 72⁰C: 10 phút, và giữ ở 4⁰C. Nồng độ các thành phần là MgCl₂: 2,5mM đối với IS1081 và 3,0mM đối với 23S rDNA, PCR buffer: 1X, dNTPs: 0,4mM, primer: 0,5μM, Tag DNA polymerase: 2,5 units.

Sử dụng PCR với một gen đích là không đủ cho chẩn đoán các chủng vi khuẩn gây bệnh lao ở trong nước hiện nay. Cần phải chạy PCR với cả 3 gen đích đồng thời (*IS6110*, *IS1081* và *23S rDNA*) giúp tăng cường chẩn đoán, tránh bỏ sót các trường hợp có mang vi khuẩn gây bệnh lao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kurabacchew *et al.* Multiplex polymerase chain reaction assay for genus-, group- and species-specific detection of mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004, 49 (2). pp 99-104.
2. Vincent J. Tevere *et al.* Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR Amplification with Pan-*Mycobacterium* Primers and Hybridization to an *M. tuberculosis*-Specific Probe. *Journal of Clinical Microbiology*, Apr, 1996, pp 918-923.
3. V. C. C. Cheng, W. W. Yew, K. Y. Yuen. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur. J Clin. Microbial Infect Dis* 24, 2004, pp 711-720.
4. VN Katoch. Advances in Molecular Dianogsis of Tuberculosis. *MJAFI*, 2003, Vol. 59, No. 3, pp 182-186.
5. Ernesto Liebana *et al.* Assessment of Genetic Marker for Species Differentiation within the *Micobacterium tuberculosis* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*, Apr. 1996, pp 933-938.
6. C M Chan, K Y Yuen, K S Chan, W C Yam, K H M Yim *et al.* Single-tube nested PCR in the diagnosis of tuberculosis. *J Clin Pathol*, 1996, 49, pp 290-294.
7. Desmond M. Collins *et al.* DNA Fingerprinting of *Mycobacterium bovis* Strain by Restriction Fragment Analysis and Hybridization with Insertion Elements IS1081 and IS6110. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, Vol. 31, No. 5, pp 1143-1147.
8. Lilly K. W. Yuen, Bruce C. Ross, Kathy M. Jackson, Brian Dwyer. Characterization of *Mycobacterium* Patients by Southern Blot Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, Vol. 31, No. 6, pp 1615-1618.