

PHÁT HIỆN *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* BẰNG KỸ THUẬT LF-RPA

BÙI THỊ LAN ANH ⁽¹⁾, HOÀNG ĐĂNG HIẾU ⁽¹⁾, NGÔ THANH NAM ⁽¹⁾,
ĐẶNG THỊ VIỆT HƯƠNG ⁽¹⁾, NGUYỄN NGỌC TÂN ⁽¹⁾, LÊ THỊ LAN ANH ⁽¹⁾,
VÕ VIỆT CƯỜNG ⁽¹⁾, CHIRSKOV P.R. ⁽²⁾, ZAKHAROVA I.B. ⁽²⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Melioidosis là bệnh truyền nhiễm ở người và động vật, bệnh thường không có triệu chứng rõ ràng, hiện nay chưa có vắc xin phòng bệnh hiệu quả. Người nhiễm bệnh có thể bị tử vong nếu không được điều trị kịp thời [1]. Tác nhân gây bệnh melioidosis là *Burkholderia pseudomallei* - vi khuẩn hoại sinh gram âm, tồn tại tự nhiên trong môi trường đất và nước ở vùng khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới. *B. pseudomallei* được Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa Dịch bệnh Hoa Kỳ (CDC) đưa vào danh sách các tác nhân nguy hiểm hàng đầu [2]. *B. pseudomallei* có thể gây nhiễm trùng ở người và động vật với nhiều biểu hiện lâm sàng khác nhau như: viêm phổi, nhiễm trùng máu, cũng như các tổn thương trên da và các cơ quan nội tạng [3]. Việc chẩn đoán kịp thời đóng vai trò rất quan trọng để hạn chế tỷ lệ tử vong của các bệnh nhân mắc melioidosis. Chẩn đoán chính xác và điều trị sớm bằng kháng sinh đặc hiệu giúp giảm tỷ lệ tử vong từ 50% xuống 10% so với các trường hợp chẩn đoán chậm [2]. Chính vì vậy, nhóm nghiên cứu đã phát triển kỹ thuật PCR, LAMP để phát hiện nhanh, chính xác *B. pseudomallei* phân lập từ chủng lâm sàng với giới hạn phát hiện là 10 CFU/ml. Đối với các mẫu ADN tách từ chủng vi khuẩn pha với đất, giới hạn phát hiện của LAMP là 10² CFU/ml và PCR là 10⁴ CFU/ml [4]. Tiếp tục ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử mới, rút ngắn thời gian phát hiện tác nhân gây bệnh, sử dụng trong các nghiên cứu tại thực địa, không cần sử dụng thiết bị PCR và hệ thống phòng thí nghiệm đi cùng, kỹ thuật Recombinase polymerase amplification (RPA) và Lateral flow - Recombinase polymerase amplification (LF - RPA) trong phát hiện *B. pseudomallei* có thể đáp ứng được các yêu cầu trên.

RPA là kỹ thuật khuếch đại ADN đẳng nhiệt ở nhiệt độ thấp (37÷42°C), đơn giản, thời gian thực hiện phản ứng ngắn (từ 15 - 30 phút), không cần phải sử dụng các trang thiết bị gia nhiệt [5]. Kỹ thuật này có thể phát hiện ADN hoặc ARN với độ nhạy cao (nồng độ axit nucleic 5 copy/μl) được ứng dụng để phát hiện các tác nhân gây bệnh bao gồm vi khuẩn, virus, ký sinh trùng [6, 7]. Thời gian diễn ra phản ứng nhanh hơn so với phương pháp PCR truyền thống (20÷180 phút), RT-PCR (3÷4 giờ) và LAMP (45~60 phút). Có thể ứng dụng kỹ thuật này trong các xét nghiệm phát hiện các tác nhân gây bệnh trong môi trường như đất, nước, mẫu dịch bệnh phẩm mà không đòi hỏi cao về độ tinh sạch của mẫu. Không những vậy, việc kết hợp kỹ thuật đẳng nhiệt RPA và que test nhanh later flow (LF-RPA) dựa trên nguyên lý phát hiện chất hiện màu biotin của sản phẩm phản ứng khuếch đại gen giúp đọc kết quả chính xác bằng mắt thường. Que được phủ lớp màng bọc với phôi tử biotin. Kỹ thuật này phát hiện tác nhân ở nồng độ thấp, thao tác đơn giản, có thể ứng dụng trong các bệnh viện dã chiến, công tác dã ngoại [8, 9, 10].

Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là phát triển kỹ thuật LF- RPA để phát hiện *B. pseudomallei*. Cặp mồi được thiết kế theo nghiên cứu của Yao Peng và cộng sự [8]. Bộ đầu dò và mồi được thiết kế trên gen orf2 của *B. pseudomallei*. Các thử nghiệm tối ưu hóa phản ứng, đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu và so sánh với hai kỹ thuật PCR và LAMP của nhóm nghiên cứu đã công bố [4] được tiến hành trên các chủng *B. pseudomallei* phân lập tại Việt Nam.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng *B. pseudomallei* V1701 (genbank: NZ_QLVC01000110.1) và 121 chủng *B. pseudomallei*, *B. cepacia*, *B. thailandensis* được phân lập tại Việt Nam giai đoạn 2016 - 2022. Bảo quản tại Viện Y sinh Nhiệt đới/TTNĐ Việt- Nga.

Chủng chuẩn *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Shigella sonnei* ATCC 9290, *Campylobacter jejuni* ATCC 33291. Môi trường nuôi cấy Tryptone Soya Agar (TSA), Himedia, Ấn Độ.

Kit tách ADN-Sorb (Amplisens - Nga). Mồi cho phản ứng RPA được tổng hợp bởi IDT (Integrated ADN technology USA), mồi theo Yao Peng và cộng sự [8]. Bộ sinh phẩm RPA TwistAmp nfo quick (TwistDX, Cambridge, UK), Milenia®HybriDetect (Milenia Biotec GmbH, Gießen, Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nuôi cấy các chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn *B. pseudomallei*, *B. cepacia*, *B. thailandensis* được nuôi cấy trên môi trường thạch Tryptic Soy (TSA) trong thời gian 24h ở nhiệt độ 37°C.

2.2.2. Xử lý các mẫu ADN tách trực tiếp từ đất

Chuẩn bị chất nền: Lựa chọn mẫu đất đã khẳng định âm tính với *B. pseudomallei* bằng kết hợp giữa nuôi cấy phân lập, phương pháp multiplex PCR, LB Nga [11, 12].

Chuẩn bị mẫu thí nghiệm: Chuẩn bị 09 ống falcon 15 ml đã khử trùng, mỗi ống chứa 2 g đất âm tính với *B. pseudomallei*. Hút 2 ml dung dịch chứa vi khuẩn *B. pseudomallei* với các nồng độ pha loãng giảm 10 lần, từ nồng độ mẫu ban đầu là 10^8 CFU/ml, 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 theo mục 2.2.5 vào các ống chứa đất. Ghi mã mẫu. Trộn đều, đồng nhất mẫu sau đó ly tâm 2000 vòng/phút. Hút 300µl dịch nổi từng ống vào các ống eppendorf 1,5 ml đánh mã tương ứng theo đúng thứ tự [4].

2.2.3. Tách chiết ADN

Bất hoạt tế bào vi khuẩn bằng dung dịch thimerosal 0,01% ở 65°C trong 30 phút. Tách ADN từ dung dịch mẫu sau bất hoạt, pha loãng và trộn với mẫu đất bằng bộ sinh phẩm ADN-Sorb (Amplisens - Nga) theo quy trình của nhà sản xuất.

2.2.4. Phản ứng LF-RPA

Trình tự mỗi probe được nhóm nghiên cứu lựa chọn: LF(F): CGCTTCAATCTGCTCTTTCCGTTGCTGTG, LF(R): (Biotin)CTCGTTGAGGC GTGAGGTGCCCCGTGTCG, Probe (Fam-idSp-3SpC3): (FAM)-GCGGCGCTGTA TCGCGGCACGACG AATTTC-(dSpacer)-ACCTACAGCAAAGATCC-C3Spacer. Đầu dò được sử dụng cho xét nghiệm LF-RPA là một đoạn nucleotide có chiều dài 46 bp với FAM được đánh dấu ở đầu 5', dSpacer được đánh dấu ở nucleotide 30 và C3spacer ở đầu 3'. Mỗi ngược của LP-RPA được gắn biotin ở đầu 5' [8].

Sử dụng bộ sinh phẩm RPA TwistAmp nfo quick, thực hiện phản ứng gồm: 2,1 µl từng môi ORF2-1F (10 µM), ORF2-1R (10 µM), 0,6 µl Probe (10 µM), 29,5 µl buffer rehydration, 12,5 µl nước đề ion. Tra 1 µl ADN mẫu vào từng ống đã ghi tên mẫu, thêm 2,5 µl Mg^{2+} nồng độ 280 mM vào từng ống. Lắc đều dung dịch, ủ tại dải nhiệt độ 30°C, 35°C, 40°C trong 20 phút.

Que test nhanh LF (Milenia®HybriDetect) phát hiện sản phẩm khuếch đại gen. Hút 20 µl sản phẩm phản ứng RPA của từng mẫu vào 80 µl dung dịch HybriDetect Assay Buffer vào ống 0,2 ml đã ghi tên mẫu tương ứng. Trộn đều, ủ 5 phút. Nhúng que test nhanh Milenia®HybriDetect vào từng ống mẫu. Đọc kết quả sau 2- 5 phút. Nếu trên thanh xuất hiện 2 vạch - mẫu dương tính, chỉ xuất hiện vạch chứng - mẫu âm tính, không xuất hiện vạch/vạch chứng không lên, thực hiện lại phản ứng.

2.2.5. Xác định giới hạn phát hiện

- Theo nồng độ ADN của chủng *B. pseudomallei* V1701 (đo bằng máy nanodrop C1000) là 6,88 ng/µl, pha loãng 10 lần để đạt dải pha loãng từ 10^{-1} đến 10^{-7} . Tiến hành chạy LF-RPA. Thí nghiệm được lặp lại 2 lần.

- Theo nồng độ vi khuẩn (CFU/ml): Chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* V1701 được nuôi cấy trên đĩa thạch TSA, hòa trong dung dịch nước muối 0,45% với nồng độ ban đầu là 10^8 CFU/ml (sử dụng phương pháp đo độ đục McFarland 0,5). Pha loãng mẫu 10 lần để tạo dải nồng độ vi khuẩn tương ứng giảm dần: 10^8 CFU/ml, 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1. Trộn với mẫu đất đã chuẩn bị theo mục 2.2.2. Tách ADN và tiến hành phản ứng LF-RPA. Thí nghiệm lặp lại 2 lần.

2.2.6. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của LF-RPA so sánh với kỹ thuật PCR, LAMP

Tiến hành phản ứng LF-RPA với 122 mẫu ADN gồm 102 mẫu ADN dương tính *B. pseudomallei*, 10 mẫu ADN dương tính *B. cepacia*; 05 mẫu ADN dương tính *B. thailandensis*, 01 mẫu ADN dương tính *B. mallei* và các ADN của các chủng vi khuẩn *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Campylobacter jejuni*. Thí nghiệm lặp lại 2 lần.

2.2.7. So sánh khả năng phát hiện *B. pseudomallei* của phương pháp LF-RPA với kỹ thuật PCR, LAMP

Kỹ thuật LF-RPA được so sánh với kỹ thuật PCR, LAMP về khả năng phát hiện vi khuẩn *B. pseudomallei* với cỡ mẫu bao gồm 102 mẫu vi khuẩn *B. pseudomallei* và 20 mẫu vi khuẩn khác dựa theo hệ số kappa (Bảng 1):

Bảng 1. Bảng số liệu tính toán hệ số kappa

Kỹ thuật thử nghiệm	Kỹ thuật khác			Tổng
	Mức độ	(+)	(-)	
	(+)	P ₁₁	P ₂₁	
	(-)	P ₁₂	P ₂₂	
Tổng		P ₀₁	P ₀₂	

Kappa	Độ tương đồng
< 0	Không tương đồng
0,0 - 0,20	Rất ít tương đồng
0,21 - 0,40	Ít tương đồng
0,41 - 0,60	Tương đồng trung bình
0,61 - 0,80	Khá tương đồng
0,81 - 1,00	Gần như tương đồng hoàn toàn

Po: Phần trăm tương đồng thực tế; Po = (P₁₁ + P₂₂)/Tổng;

Pe: Phần trăm tương đồng mong đợi;

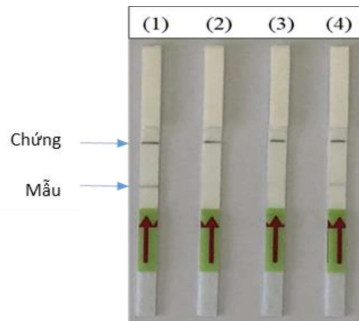
$$P_e = \frac{\frac{P_{10} \times P_{01}}{T_{\text{tổng}}} + \frac{P_{20} \times P_{02}}{T_{\text{tổng}}}}{T_{\text{tổng}}}$$

$$\text{Công thức tính hệ số kapp} \quad \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e} \quad [13]$$

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Khảo sát nhiệt độ khuếch đại phản ứng LF-RPA phát hiện *B. pseudomallei*

Kết quả tối ưu hóa phản ứng LF-RPA tại dải nhiệt độ 30°C, 35°C, 40°C trong khoảng thời gian 20 phút cho thấy tại nhiệt độ 40°C cho kết quả trên thanh LF-RPA rõ nét nhất (Hình 1). Do đó chúng tôi lựa chọn nhiệt độ khuếch đại RPA là 40°C trong 20 phút để đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu.



Hình 1. Phát hiện *B. pseudomallei* bằng LF-RPA ở các nhiệt độ khác nhau lần lượt là (1), (3), (4) - ADN của mẫu V1701 dương tính tại 40°C, 30°C, 35°C; (2) - âm tính

3.2. Xác định giới hạn phát hiện của phản ứng LF-RPA

3.2.1. Giới hạn phát hiện theo nồng độ ADN

ADN của *B. pseudomallei* V1701 (nồng độ 6,88 ng/μL) được pha loãng 10 lần từ 10⁻¹ đến 10⁻⁷, tiến hành phản ứng LF-RPA, thí nghiệm được lặp lại 2 lần (Bảng 2).

Bảng 2. Giới hạn phát hiện theo nồng độ ADN

Độ pha loãng		10⁻¹ (688 pg/μL)	10⁻² (~68,8 pg/μL)	10⁻³ (~6,9 pg/μL)	10⁻⁴ (~688 fg/μL)	10⁻⁵ (~68,8 fg/μL)	10⁻⁶ (~6,9 fg/μL)	10⁻⁷ (~0,7 fg/μL)
LF-RPA	Lần 1	+	+	+	+	+	-	-
	Lần 2	+	+	+	+	+	-	-

Kết quả Bảng 2 cho thấy giới hạn phát hiện theo nồng độ ADN của LF- RPA là ~ 68,8 fg/μL. Như vậy so với kỹ thuật LAMP, giới hạn phát hiện là tương đương. Kỹ thuật này phát hiện *B. pseudomallei* ở nồng độ ADN thấp hơn 10 lần so với kỹ thuật PCR do nhóm nghiên cứu thiết kế [4].

3.2.2. Giới hạn phát hiện theo nồng độ vi khuẩn

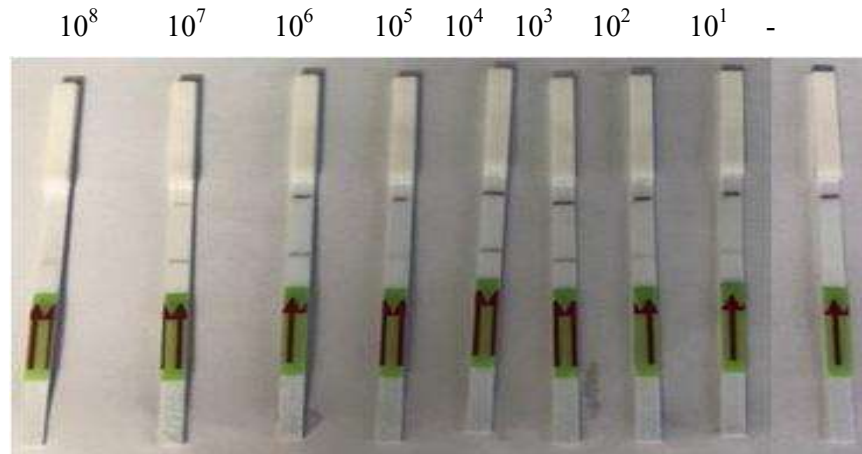
Vi khuẩn *B. pseudomallei* tồn tại tự nhiên ở các lớp đất sâu. Việc phát hiện tác nhân này trực tiếp từ mẫu đất sẽ không ổn định do trong đất chứa rất nhiều các hợp chất và các nhóm vi sinh vật có thể gây nhiễu, dẫn đến kết quả không chính xác. Vì vậy, để có thể xác định được chính xác giới hạn phát hiện *B. pseudomallei* từ mẫu đất, nhóm nghiên cứu đã thiết kế môi trường chứa vi khuẩn *B. pseudomallei* và dung dịch đất với nồng độ *B. pseudomallei* pha loãng giảm 10 lần tương ứng là: 10⁸ (CFU/ml), 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10. Tách ADN các mẫu này và tiến hành xác định giới hạn phát hiện của LF-RPA so với PCR và LAMP, kết quả tại Bảng 3.

Bảng 3. Giới hạn phát hiện theo nồng độ vi khuẩn

Nồng độ pha loãng		10⁸ (CFU/ml) (1)	10⁷ (2)	10⁶ (3)	10⁵ (4)	10⁴ (5)	10³ (6)	10² (7)	10 (8)
PCR	Lần 1	+	+	+	+	+	-	-	-
	Lần 2	+	+	+	+	+	-	-	-
LAMP	Lần 1	+	+	+	+	+	+	+	-
	Lần 2	+	+	+	+	+	+	+	-
LF-RPA	Lần 1	+	+	+	+	+	+	+	+
	Lần 2	+	+	+	+	+	+	+	+

Từ Bảng 3 nhận thấy, kỹ thuật PCR chỉ phát hiện được *B. pseudomallei* tại nồng độ pha loãng 10⁴ CFU/300μl dung dịch mẫu đất, LAMP có giới hạn phát hiện ổn định tại nồng độ pha loãng 10²CFU/300μl dung dịch mẫu đất, trong đó LF-RPA có thể phát hiện được *B. pseudomallei* tại nồng độ pha loãng 10 CFU/300 μl (~33 CFU/ml). So với kỹ thuật LAMP và PCR trong cùng một điều kiện nghiên cứu, LF-RPA có thể phát hiện *B. pseudomallei* tại nồng độ thấp hơn 10 -100 lần.

Việc thiết kế phản ứng RPA kết hợp với que test nhanh LF giúp người làm dễ dàng đọc kết quả chính xác. Kết quả thử nghiệm các dải nồng độ khác nhau trên thanh LF được thể hiện trong Hình 2.



Hình 2. Hình ảnh que test nhanh LF-RPA phát hiện *B. pseudomallei*

3.3. So sánh độ nhạy, độ đặc hiệu phương pháp PCR, LAMP, LF-RPA phát hiện *B. pseudomallei*

Loài *Burkholderia* spp. tương đồng về kiểu hình, tính chất sinh hóa và kiểu gen. Vì vậy, để xác định tính đặc hiệu của phương pháp PCR và LAMP và LF-RPA. Vì vậy, để đánh giá độ đặc hiệu của LF-RPA, ngoài việc sử dụng các loại vi khuẩn thông thường khác như *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Campylobacter jejuni*, nhóm nghiên cứu đã sử dụng các vi khuẩn thuộc phức hợp *Burkholderia* spp. là *B. cepacia*, *B. thailandensis*, *B. mallei*. Đây là các vi khuẩn khó có thể phân biệt được chính xác nếu chỉ dựa vào các đặc điểm kiểu hình.

Bảng 4. Kết quả định danh các vi khuẩn

STT	Tên vi khuẩn	Số lượng	Kết quả			
			Multiplex-PCR	PCR	LAMP	LF-RPA
1	<i>B. cepacia</i>	10	10	-	-	-
2	<i>B. thailandensis</i>	05	05	-	01	-
3	<i>B. mallei</i>	01	01	-	-	-
4	Nhóm vi khuẩn *	04	-	-	-	-
5	<i>B.pseudomallei</i>	102	102	102	102	102
	Tổng	122				

Nhóm vi khuẩn*: *Salmonella* ATCC 14028; *Shigella sonnei* ATCC 9290; *Campylobacter jejuni* ATCC 33291; *E. coli* ATCC 25922.

Nhận thấy cả LF-RPA, PCR và LAMP đều phát hiện được chính xác 102 chủng *B. pseudomallei* (Bảng 4).

Bảng 5. Phân tích độ nhạy, độ đặc hiệu của LF-RPA so với PCR, LAMP

Số lượng chủng	LF-RPA			PCR			LAMP		
	+	-	Tổng	+	-	Tổng	+	-	Tổng
102 <i>B.pseudomallei</i>	102	0	102	102	0	102	102	0	102
20 <i>Vi khuẩn khác</i>	0	20	20	0	20	20	01	19	20
Tổng	102	20	122	102	20	122	103	19	122
Độ nhạy S (%)	100%			100%			99%		
Độ đặc hiệu Q (%)	100%			100%			100%		

Nhận thấy, trong thiết kế đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu phát hiện *B. pseudomallei*, phương pháp PCR và LF-RPA cho thấy S = 100% và Q = 100% và đối với LAMP có S = 99% và Q = 100%; Điều này chứng tỏ rằng kỹ thuật LF-RPA, PCR và LAMP mà chúng tôi phát triển có độ chính xác cao trong việc phát hiện *B. pseudomallei* (Bảng 5).

Bảng 6. Xác định hệ số tương quan Cohen's kappa

LF-RPA	PCR				LF-RPA	LAMP			
	Mức độ	(+)	(-)	Tổng		Mức độ	(+)	(-)	Tổng
	(+)	102	0	102		(+)	102	0	102
	(-)	0	20	20		(-)	01	19	20
Tổng		102	20	122	Tổng		103	19	122
Po =	1				Po =	0,99			
Pe =	0,73				Pe =	0,73			
Hệ số Kappa =	1				Hệ số Kappa =	0,96			

Hệ số Kappa được sử dụng để đánh giá mức độ tương đồng giữa 2 phương pháp khi chẩn đoán cùng tác nhân gây bệnh, sau khi đã loại bỏ vai trò của yếu tố may rủi. Kết quả xác định hệ số kappa giữa phương pháp LF-RPA và PCR, LAMP được thể hiện trong (Bảng 6). Hệ số kappa K = 1 khi so sánh với PCR và K = 0,96 khi so sánh với LAMP cho thấy kết quả phát hiện *B. pseudomallei* của phương pháp LF-RPA gần như tương đồng hoàn toàn với hai phương pháp PCR, LAMP.

Có thể nói rằng, khuếch đại ADN là yếu tố chính trong xét nghiệm axit nucleic, tuy nhiên những phương pháp này đòi hỏi thiết bị gia nhiệt hiện đại, đắt tiền (PCR, realtime PCR) cũng như các quy trình xét nghiệm phức tạp và tuân thủ

nghiêm ngặt các thao tác tại phòng thí nghiệm. Để khắc phục các nhược điểm này, trong thập kỷ qua, nghiên cứu khuếch đại ADN/ARN bằng phương pháp đẳng nhiệt trong chẩn đoán phân tử đã phát triển nhanh chóng. Các phương pháp LAMP và LF-RPA được ứng dụng có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Ưu điểm của các phương pháp này là không sử dụng máy PCR, có thể nhìn thấy bằng mắt thường, thời gian thực hiện nhanh và ít bị ức chế bởi các thành phần khác khi tách ADN trực tiếp từ mẫu môi trường như đất, nước. Trong nghiên cứu này, với các mẫu ADN phân lập từ vi khuẩn trộn trong đất, giới hạn phát hiện của LF-RPA là tốt nhất so với PCR và LAMP. Kỹ thuật này có thể phát hiện *B. pseudomallei* ở nồng độ là ~ 10 CFU/300 μ l so với LAMP là 10^2 CFU/300 μ l và PCR là 10^3 CFU/300 μ l theo phương pháp pha loãng. Theo Wongsuvan và cộng sự (2009), nồng độ vi khuẩn *B. pseudomallei* tồn tại thấp nhất trong mẫu máu (từ 0,1 đến 100 CFU/ml) và cao nhất trong mẫu đờm ($10^2 - 10^9$ CFU/ml) [14]. Như vậy có thể sử dụng kỹ thuật LF-RPA cho các mẫu phát hiện trực tiếp với nồng độ vi khuẩn *B. pseudomallei* thấp. So sánh với kỹ thuật PCR-LFD (PCR kết hợp với que test nhanh LFD) của Priyapa Najomtien và cộng sự [15], cả hai kỹ thuật đều có ưu điểm có thể quan sát bằng mắt thường trên que test LF, kỹ thuật LF-RPA có thể phát hiện được tại nồng độ $\sim 68,8$ fg/ μ L, tương đồng với PCR-LFD (~ 50 fg/ μ L) đối với các mẫu ADN tách từ chủng vi khuẩn. Tuy nhiên thời gian thực hiện LF-RPA ngắn hơn 30 - 45 phút so với PCR-LFD cũng là ưu điểm trong trường hợp cần trả kết quả nhanh, đáp ứng yêu cầu trong chẩn đoán sớm.

Melioidosis là bệnh lưu hành phổ biến ở các vùng nhiệt đới nhưng hiện nay melioidosis đã xuất hiện ở nhiều nơi trên thế giới cả vùng ôn đới, cận ôn đới. Tác nhân gây bệnh melioidosis là tác nhân nguy hiểm tiềm tàng do nó có khả năng được sử dụng trong sản xuất vũ khí sinh học và được xếp vào loại “B” trong danh sách các tác nhân sinh học gây bệnh truyền nhiễm. Nguy cơ nhiễm trùng đường hô hấp do *B. pseudomallei* gây ra là rất cao [16]. Vì vậy, việc xác định chính xác và nhanh chóng mầm bệnh *B. pseudomallei* sẽ giúp chẩn đoán và điều trị kịp thời các bệnh lâm sàng, làm giảm tỷ lệ tử vong do nhiễm trùng huyết. Đặc biệt ở những cơ sở y tế chưa được đồng bộ trang thiết bị sinh học phân tử, việc sử dụng kỹ thuật LF-RPA và LAMP sẽ giúp giảm thời gian xét nghiệm, tiết kiệm chi phí và đáp ứng nhanh chóng việc điều trị bệnh.

4. KẾT LUẬN

Kỹ thuật đẳng nhiệt LF-RPA phát hiện *B. pseudomallei* có độ nhạy, độ đặc hiệu cao trong nghiên cứu này (đạt 100%). Đối với mẫu ADN tách từ các chủng vi khuẩn, giới hạn phát hiện *B. pseudomallei* là 68,8 fg/ μ L hoặc 10 CFU/300 μ l đối với các mẫu tách ADN từ đất. Thời gian thực hiện nhanh, thao tác đơn giản, sinh phẩm được bảo quản ở nhiệt độ thường, không cần sử dụng các thiết bị hiện đại. Ưu điểm của kỹ thuật này có thể quan sát bằng mắt thường rõ nét, ít bị ức chế bởi các thành phần khác khi tách ADN trực tiếp từ mẫu môi trường như đất, nước. Tương tự như LAMP, LF-RPA phát hiện *B. pseudomallei* đáp ứng những điều kiện cần thiết để ứng dụng trong các chuyên công tác dã ngoại, tại các khu vực đồi núi, hải đảo xa, nơi chưa có các phòng thí nghiệm hiện đại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. James D., Simon S., Enzo B., William J. M., Bart J. C., Josh H., *The epidemiology and clinical features of melioidosis in Far North Queensland: Implications for patient management*, PLoS Negl Trop Dis, 2017, **11**(3): e0005411. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005411
2. Wiersinga, W. J., et al., *Melioidosis*, Nature Reviews Disease Primers, 2018, **4**(1):17107.
3. Currie B. J., *Melioidosis: an important cause of pneumonia in residents of and travellers returned from endemic regions*, Eur. Respir. J., 2003, **22**(3):542-50. DOI: 10.1183/09031936.03.00006203.
4. Bùi Thị Lan Anh, Phạm Thị Hà Giang, Lê Thị Lan Anh, Võ Viết Cường, Phạm Việt Hùng, Quế Anh Trâm, Irina Zakharova, Dmitry Viktorov, *Phát triển và đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật PCR và LAMP trong việc phát hiện Burkholderia pseudomallei*, Tạp chí Y học Dự phòng, 2020, **3**:55- 62. <https://doi.org/10.51403/0868-2836/2020/261>
5. Rosser A., Rollinson D., Forrest M., Webster B. L., *Isothermal Recombinase Polymerase amplification (RPA) of Schistosoma haematobium ADN and oligochromatographic lateral flow detection*, Parasit Vectors, 2015, **8**:446. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1055-3> PMID: 26338510.
6. Vasileva Wand N. I., Bonney L. C., Watson R. J., Graham V., Hewson R., *Point-of-care diagnostic assay for the detection of Zika virus using the recombinase polymerase amplification method*, J. Gen. Virol., 2018, **99**(8):1012-1026. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001083> PMID: 29897329.
7. Castellanos-Gonzalez A., White A. C., Jr., Melby P., Travi B., *Molecular diagnosis of protozoan parasites by Recombinase Polymerase Amplification*, Acta Tropica, 2018, **182**:4-11. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.002> PMID: 29452112.
8. Yao Peng, Xiao Zheng, Biao Kan, Wei Li, Wen Zhang, Taozhen Jiang, Jinxing Lu, Aiping Qin., *Rapid detection of Burkholderia pseudomallei with a lateral flow recombinase polymerase amplification assay*, PLoS One, 2019, **14**(7):e0213416. DOI: 10.1371/journal.pone.0213416
9. Wu H., Zhao P., Yang X., Li J., Zhang J., Zhang X., *A recombinase polymerase amplification and lateral flow strip combined method that detects salmonella enterica serotype typhimurium with no worry of primer-dependent artifacts*, Front. Microbiol., 2020, **11**(1015). doi: 10.3389/fmicb.2020.01015.
10. Jaroenram W., Kiatpathomchai W., Flegel T. W., *Rapid and sensitive white spot syndrome virus detection by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick*, Mol. Cell. Probes., 2009, **23**(2):65-70. doi: 10.1016/j.mcp.2008.12.003.
11. Zakharova I., Teteryatnikova N., Toporkov A., Viktorov D., *Development of a multiplex PCRRassay for the detection and differentiation of Burkholderia pseudomallei, Burkholderia mallei, Burkholderia thailandensis, and Burkholderiacepacia complex*, Acta Tropica, 2017, **174**:1. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.06.016

12. Bùi Thị Lan Anh, Ngô Thanh Nam, Dương Tuấn Linh. *Phát hiện và phân loại Burkholderia spp. từ mẫu đất Nghệ An*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ nhiệt đới, 2017, **13**:174-176. DOI:10.58334/vrtc.jtst.n13.20
13. McHugh M. L., *Interrater reliability: the kappa statistic*, Biochem. Med. (Zagreb), 2012, **22**(3):276-82. DOI:10.11613/BM.2012.031
14. Wongsuvan G., Limmathurotsakul D., Wannapasni S., et al., *Lack of correlation of Burkholderia pseudomallei quantities in blood, urine, sputum and pus*, Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 2009, **40**(4):781-4.
15. Najomtien P., Phoksawat W., Khammanthoon S., Klasuk W., Srisurat N., Chattagul S., Photisap C., Pipattanaboon C., Sermswan R. W., *PCR combined with lateral flow dipstick assay (PCR-LFD) for a rapid diagnosis of melioidosis*, Asian Pac. J. Allergy Immunol., 2024, <https://doi.org/10.12932/ap-021023-1703>.
16. Dance D. A., Limmathurotsakul D. *Global burden and challenges of melioidosis*, Trop. Med. Infect. Dis., 2018, **3**(1):13. DOI: 10.3390/tropicalmed3010013.

SUMMARY

DETECTION OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* USING LF-RPA

The application of the LF-RPA molecular biology technique in quickly and accurately detecting *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis in Vietnam, was essential. This method yielded rapid results within 15 to 25 minutes, involved straightforward experimental procedures, and enabled the storage of biological products at room temperature. Additionally, it did not require PCR equipment or a modern laboratory system, and the results could be easily observed with the naked eye. The LF-RPA technique has demonstrated 100% sensitivity and specificity in detecting *B. pseudomallei*. The detection limit of the LF-RPA test was 68.8 fg/μL of bacterial DNA or 10 CFU per 300 μL. DNA was directly extracted from soil samples with low purity. This was a key advantage for applying LF-RPA and LAMP techniques in mountainous regions and islands, where modern laboratories were unavailable or in cases where field testing was necessary.

Keywords: LF-RPA, *Burkholderia pseudomallei*, ADN, PCR, sensitivity, specificity, độ nhạy, độ đặc hiệu.

Nhận bài ngày 12 tháng 3 năm 2024

Phản biện xong ngày 12 tháng 4 năm 2024

Hoàn thiện ngày 22 tháng 8 năm 2024

⁽¹⁾ Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

⁽²⁾ Viện Phòng chống dịch hạch Volgograd, Liên bang Nga

Liên hệ: Bùi Thị Lan Anh

Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga
Số 63 Nguyễn Văn Huyền, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội
Điện thoại: 0948246464; Email: lananhrus@gmail.com