

PHÁT HIỆN GENE BẢN THỂ OXA-51-LIKE CỦA *Acinetobacter baumannii* BẰNG PHƯƠNG PHÁP REAL-TIME PCR

NGUYỄN VĂN HIỆP ⁽¹⁾, NGUYỄN TUẤN ANH ⁽²⁾, NGUYỄN PHƯƠNG NAM ⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Acinetobacter baumannii là một trong các chủng *Acinetobacter* spp. có cấu trúc của một cầu - trực khuẩn Gram âm, có nguồn gốc từ thiên nhiên (đất, nước) với tính chất sinh học thay đổi tùy theo điều kiện và môi trường sống, giúp vi khuẩn có thể tồn tại lâu trong môi trường, đặc biệt ở các dụng cụ y tế dùng chăm sóc và điều trị bệnh nhân của bệnh viện. *Acinetobacter baumannii* có đặc tính sinh học rất đặc biệt là có khả năng tạo màng sinh học biofilm, nhờ khả năng bám dính của màng sinh học biofilm, giúp vi khuẩn gắn chặt vào bề mặt dụng cụ, môi trường và tạo điều kiện cho vi khuẩn dễ dàng tồn tại lâu dài, thu nhận, tích lũy gen kháng kháng sinh và trở thành tác nhân gây khó khăn trong điều trị và kiểm soát lây nhiễm [1÷4].

Có nhiều loài *Acinetobacter* và tất cả chúng đều có khả năng gây bệnh cho người, trong đó *A. baumannii* chiếm hơn 80% trường hợp bị nhiễm bởi các chủng thuộc *Acinetobacter* spp. *A. baumannii* có thể gây nhiễm trùng vết thương, nhiễm trùng máu, viêm phổi, viêm đường niệu, viêm màng não và hay kèm theo sốc nhiễm khuẩn... Sự nguy hiểm khi nhiễm *A. baumannii* ở chỗ hiện nay vi khuẩn này có khả năng kháng lại hầu hết các loại kháng sinh như β -lactam (penicillin, cephalosporin, carbapenem), tetracycline, aminoglycoside, fluoroquinolone... Điều này khiến nó trở thành loại vi khuẩn siêu kháng thuốc, đặc biệt nguy hiểm cho những bệnh nhân nằm viện lâu ngày, phải dùng các biện pháp can thiệp như ống thở hay kim truyền liên tục, dùng quá nhiều kháng sinh hoặc bị suy giảm miễn dịch. Vì vậy, việc chẩn đoán chính xác bệnh nhân nhiễm *A. baumannii* là rất cần thiết để kịp thời điều trị [5, 6].

Hiện nay, phương pháp phát hiện *A. baumannii* chủ yếu là phương pháp nuôi cấy truyền thống vì *A. baumannii* rất dễ nuôi cấy. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp này là phải mất ít nhất 1 ngày để phân lập, định danh vi khuẩn. Hình thái (que ngắn, nhầy) và đặc tính khó tẩy màu làm nó dễ bị định danh nhầm với các vi khuẩn Gram (-) và (+) hình cầu khác. Và hệ vi khuẩn *A. Calcoaceticus* - *A. baumannii* lại giống với *Enterobacteriaceae* khi nuôi cấy qua đêm đều có đường kính khuẩn lạc từ 1,5÷3,0 mm. Hơn nữa, chưa có phản ứng sinh hóa biến dưỡng đặc trưng có thể giúp phân biệt *Acinetobacter* với các vi khuẩn Gram (-) không lên men khác [7, 8].

Một trong những gen kháng kháng sinh của *A. baumannii* có khả năng kháng với nhiều loại kháng sinh khác nhau và kháng với cả carbapenem đặc trị cho chúng được biết đến là gen Oxacilinase (OXA). Các gen này thường được mã hóa trên plasmid và nhiễm sắc thể giúp *A. baumannii* có khả năng kháng nhiều loại thuốc, lây lan và gây dịch [1÷4].

Nghiên cứu này nhằm đến khả năng phát hiện nhanh nhóm gen OXA-51-like, là gen bản thể đặc trưng của vi khuẩn *A. baumannii* bằng real-time PCR. Ưu điểm của phương pháp này là thời gian thực hiện ngắn, trong khoảng 3÷4 h, có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, không cần bước điện di sản phẩm PCR, hạn chế ngoại nhiễm, đỡ tốn thời gian khi thực hiện quy trình kỹ thuật, khả năng thực hiện nhiều mẫu cùng một lúc.

2. MỤC ĐÍCH, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục đích

Xây dựng thành công quy trình real-time PCR (multiplex) sử dụng màu huỳnh quang EvaGreen để phát hiện nhanh gene bản thể OXA-51-like của *Acinetobacter baumannii*.

2.2. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *A. baumannii* (ATCC 19606) và các mẫu DNA / vi khuẩn *A. baumannii* được phân lập từ bệnh phẩm của bệnh nhân điều trị ở một số bệnh viện, được lưu giữ tại Phân môn Sinh học phân tử, Bộ môn Xét nghiệm, Khoa Điều dưỡng Kỹ thuật Y học, Đại học Y dược TP. HCM.

Các cặp mồi đặc hiệu cho gene OXA-51-like của *A. baumannii* và gene 16S rRNA của *Acinetobacter* spp. đã được công bố trước đây [2].

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp tách chiết DNA của *A. baumannii*

Khuẩn lạc đơn, đặc trưng của *A. baumannii* được thu nhận và tăng sinh trong môi trường Luria-Bertani ở điều kiện 37°C trong 16 ÷ 24 giờ.

Sau khi kết thúc tăng sinh, DNA tổng số của *A. baumannii* được tách chiết theo nguyên tắc hấp phụ đặc hiệu lên pha rắn (màng silica) bằng bộ kit tách chiết “DNA column-based extraction kit” (Khoa Thương). Tất cả mọi thao tác đều được thực hiện theo đúng hướng dẫn trong bộ kit của nhà sản xuất. Sản phẩm DNA sau tách chiết được đánh giá chất lượng bằng phương pháp quang phổ. Giá trị OD_{260/280} từ 1,6 ÷ 1,8 được chấp nhận là đủ tiêu chuẩn cho phản ứng real-time PCR sau này.

2.3.2. Thành phần và điều kiện phản ứng real-time PCR

Thành phần tham gia phản ứng real-time PCR gồm AptaTaq Fast DNA polymerase (Roche), cặp mồi OXA-51-F/R và cặp mồi 16S rRNA-F/R (IDT), EvaGreen (Biotium) và DNA đích của *A. baumannii*.

2.3.3. Phương pháp tối ưu quy trình real-time PCR sử dụng EvaGreen

Quy trình real-time PCR phát hiện gene OXA-51-like của *A. baumannii* được xây dựng qua các bước chính: (1) tối ưu hóa phản ứng có một cặp mồi; (2) tối ưu hóa phản ứng có hai cặp mồi; (3) đánh giá độ nhạy và tính đặc hiệu; (4) thử nghiệm quy trình.

Tiêu chí đánh giá phản ứng real-time PCR sử dụng EvaGreen tối ưu là các đỉnh chảy rõ ràng, phân biệt và có nhiệt độ nóng chảy T_m xác định. Tính đặc hiệu của quy trình được đánh giá qua khả năng phát hiện đúng DNA của *A. baumannii* mà không phát hiện nhầm lẫn vật liệu di truyền của các vi khuẩn khác. Độ nhạy hay giới hạn phát hiện của quy trình là số bản sao *A. baumannii* tối thiểu mà hệ thống còn cho tín hiệu và kết quả dương tính. Phương pháp thống kê mô tả được sử dụng để đánh giá khi quy trình được áp dụng thử nghiệm.

Sử dụng real-time PCR để định tính (xác định âm hay dương) phát hiện gene OXA-51-like của *A. baumannii*.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

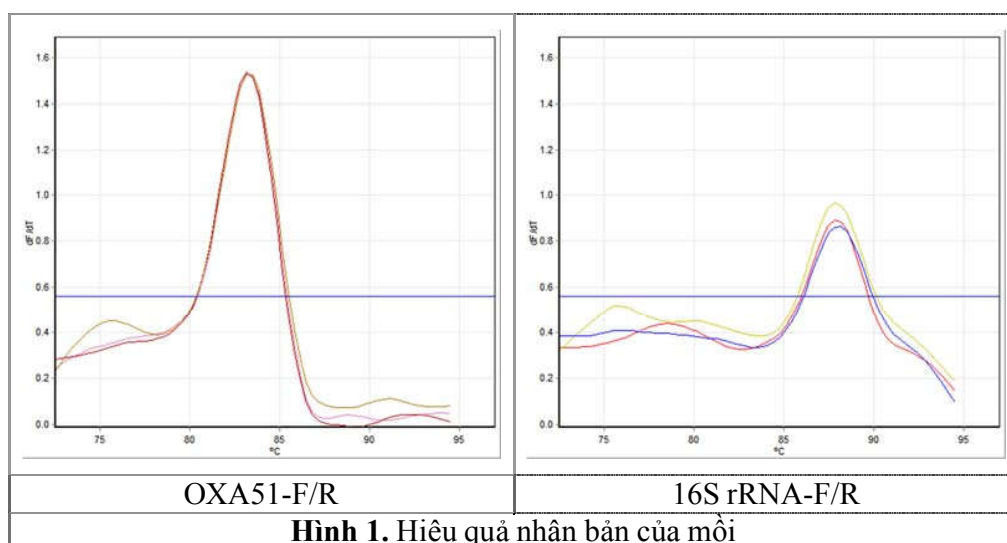
3.1. Tối ưu hóa phản ứng real-time PCR với một cặp mồi (monoplex)

3.1.1. Phản ứng real-time PCR với một cặp mồi

Hiệu quả nhân bản của từng cặp mồi OXA51-F/R và 16s rRNA-F/R được đánh giá bằng phản ứng real-time PCR sử dụng EvaGreen trên mẫu DNA tách chiết từ vi khuẩn *A. baumannii* chuẩn - ATCC 19606 (2×10^3 bản sao/ μ l). Chúng vi khuẩn này đã được xác định sở hữu các gene ^{bla}OXA-51 bằng phương pháp giải trình tự gene.

Thành phần phản ứng monoplex real-time PCR với từng cặp mồi tương ứng bao gồm 1.5X AptaTaq Fast DNA polymerase (Roche), 200 nM cho từng cặp mồi xuôi và ngược (IDT), 1X EvaGreen (Biotium) và 5 μ l DNA đích của *A. baumannii* trong tổng thể tích là 25 μ l.

Chương trình nhiệt cho phản ứng real-time PCR: 40 chu kỳ gồm 15 giây - 95°C và 30 giây - 60°C. Chương trình phân tích nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm tương ứng với quá trình tăng nhiệt độ từ 65°C lên 95°C, mỗi bước tăng 0,5°C và lưu trong 20 giây. Tín hiệu được thu nhận với màu huỳnh quang đặc trưng là FAM (510÷530 nm).



Hình 1. Hiệu quả nhân bản của mồi

Kết quả hình 1 cho thấy, chỉ một đỉnh chảy đặc trưng tương ứng với mỗi cặp mồi, không hiện diện các đỉnh chảy (sản phẩm) ký sinh. Như vậy, hoạt động nhân bản của các bộ mồi tốt trong phản ứng PCR. Kết quả cũng cho thấy nhiệt độ nóng chảy T_m đặc trưng, trung bình của sản phẩm PCR OXA-51-like là $83,3 \pm 0,05^\circ\text{C}$ và của sản phẩm 16S rRNA là $87,9 \pm 0,09^\circ\text{C}$. Vì chỉ có một cặp mồi trong mỗi phản ứng nên không có sự cạnh tranh trong nội bộ phản ứng, phản ứng real-time PCR sử dụng EvaGreen với từng cặp mồi đơn được xem là đã tối ưu.

3.1.2. Đánh giá tính đặc hiệu của môi

Tính đặc hiệu của môi OXA-51 và 16S rRNA được đánh giá dựa trên tính đặc hiệu của phản ứng real-time PCR và đặc hiệu về trình tự của sản phẩm được nhân bản khi được giải trình tự gene.

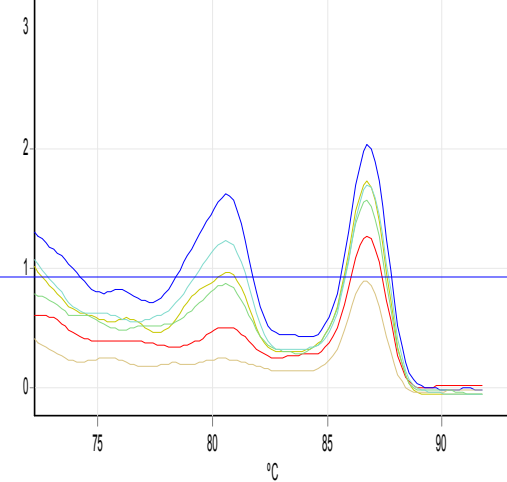
Tính đặc hiệu của phản ứng được kiểm tra với DNA đặc trưng của *A. baumannii* (ATCC 19606) và DNA của các vi khuẩn khác, không phải *A. baumannii* như: *E.coli* (ATCC 25922, 35218, 35401, 11775), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Salmonella typhi* (ATCC 13311), *Salmonella typhimurium* (ATCC 29946), *Helicobacter pylori* (ATCC 700824, 51932), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802), *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*.

Kết quả cho thấy, chỉ những mẫu DNA của *A. baumannii* (ATCC 19606) mới cho tín hiệu dương tính với đỉnh chảy đặc hiệu và trình tự chính xác là của *A. baumannii* ($83,3 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$), với mẫu DNA của những vi khuẩn khác thì hoàn toàn không có đỉnh chảy đặc trưng của *A. baumannii*.

3.2. Tối ưu hóa phản ứng real-time PCR với hai cặp môi (multiplex)

3.2.1. Phản ứng real-time PCR với đồng thời hai cặp môi

Kết quả hình 1 cho thấy, nhiệt độ nóng chảy T_m của các sản phẩm nhân bản trình tự gene OXA-51-like ($83,3 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$) và 16S rRNA ($87,9 \pm 0,09^{\circ}\text{C}$) có tính đặc trưng và phân biệt. Vì thế, có khả năng kết hợp hai phản ứng này thành một phản ứng duy nhất, đồng thời căn cứ vào nhiệt độ nóng chảy đặc trưng và phân biệt của từng sản phẩm tương ứng trên giải nhiệt độ nóng chảy có thể nhận biết được sự hiện diện của các gene tương ứng.



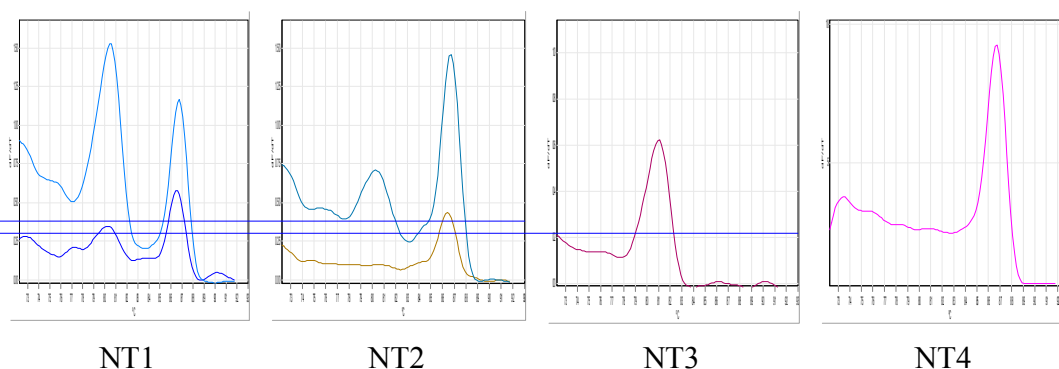
Hình 2. Hiệu quả nhân bản của các môi trong phản ứng multiplex

Kết quả hình 2 cho thấy, các môi OXA-51-F/R và 16S rRNA-F/R khi kết hợp trong một phản ứng real-time PCR sử dụng EvaGreen cho phép nhân bản hai sản phẩm đặc hiệu với đỉnh chảy đặc trưng và duy nhất cho từng gene tương ứng. Tuy nhiên, sản phẩm của cặp môi OXA-51-F/R có vẻ hơi yếu hơn so với cặp môi 16S rRNA-F/R. Vì thế, bước tiếp theo trong quá trình tối ưu, nhóm tác giả sẽ tối ưu theo hướng giảm nồng độ môi 16S rRNA-F/R xuống để giảm sự ức chế của môi này trên môi OXA-51-F/R trong hỗn hợp phản ứng.

3.2.2. Tối ưu nồng độ hỗn hợp môi

Nồng độ môi OXA-51-F/R được giữ ổn định (200 nM) trong khi nồng độ môi 16S rRNA-F/R được giảm xuống (100 nM). Các thành phần khác giữ nguyên như trong phản ứng trước.

Các nghiệm thức (NT) được bố trí như sau: NT1 là phản ứng multiplex hai cặp môi, OXA-51-F/R (200 nM) và 16S rRNA-F/R (100 nM); NT2 là phản ứng multiplex hai cặp môi, OXA-51-F/R (200 nM) và 16S rRNA-F/R (200 nM); NT3 là phản ứng monoplex với một cặp môi OXA-51-F/R (200 nM) và NT4 là phản ứng monoplex với một cặp môi 16S rRNA-F/R (200 nM).



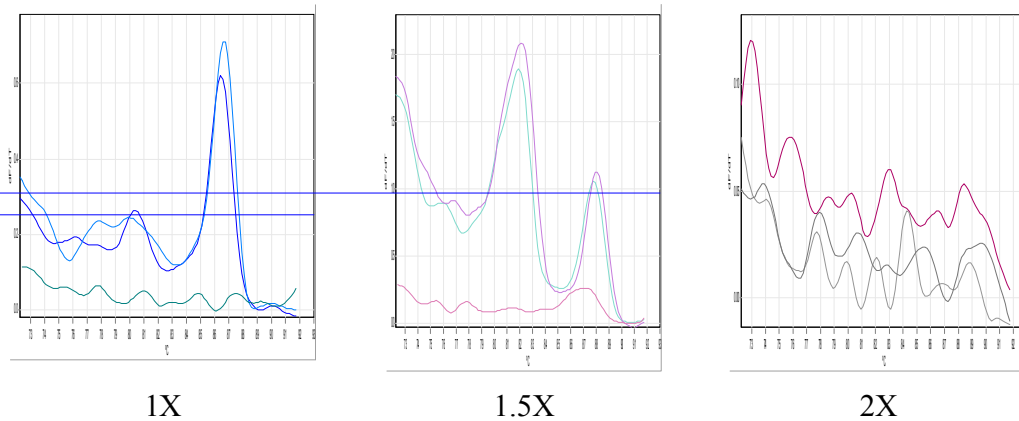
Hình 3. Tối ưu nồng độ hỗn hợp môi

Kết quả hình 3 cho thấy, nồng độ hỗn hợp môi OXA-51-F/R và 16S rRNA-F/R lần lượt là 200 nM và 100 nM cho hiệu quả nhân bản tốt hơn nồng độ hỗn hợp môi còn lại, vì cả hai mẫu thí nghiệm đều lên tín hiệu ở các đỉnh chảy đặc trưng tương ứng.

3.2.3. Tối ưu nồng độ enzyme

Để tín hiệu của các đỉnh chảy sản phẩm rõ ràng, phân biệt và dễ nhìn, tức là hiệu suất nhân bản của các môi trong hỗn hợp phản ứng được tối ưu, không ức chế lẫn nhau, nồng độ enzyme được tối ưu tiếp theo. Nồng độ enzyme được chọn để tối ưu trong 3 nghiệm thức lần lượt là 1X, 1.5X và 2X.

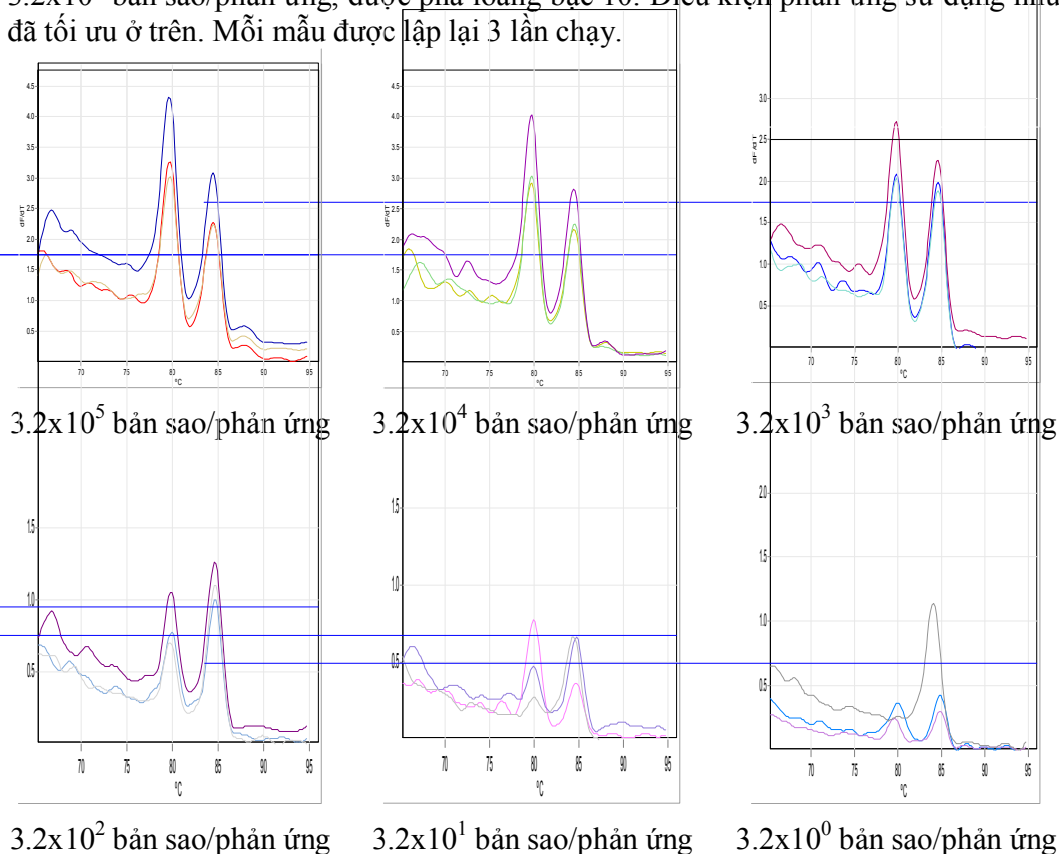
Kết quả hình 4 cho thấy, nồng độ enzyme 1.5X cho đường tín hiệu của các mẫu đẹp nhất và rõ ràng giữa các sản phẩm đặc trưng, phân biệt khác nhau. Nồng độ này được xác nhận là nồng độ enzyme tối ưu cho phản ứng.



Hình 4. Tối ưu nồng độ enzyme

3.3. Độ nhạy của phản ứng multiplex

Để kiểm tra độ nhạy của phản ứng real-time PCR sử dụng EvaGreen với hai cặp mồi OXA-51-F/R và 16S rRNA-F/R, thí nghiệm được tiến hành với DNA tách chiết từ mẫu tế bào vi khuẩn *A. baumannii* (ATCC 19606) có nồng độ đo được là 3.2×10^6 bản sao/phản ứng, được pha loãng bậc 10. Điều kiện phản ứng sử dụng như đã tối ưu ở trên. Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần chạy.



Hình 5. Khảo sát độ nhạy của phản ứng multiplex

Kết quả hình 5 cho thấy, phản ứng real-time PCR sử dụng EvaGreen cho tín hiệu dương tính ổn định với mẫu DNA có nồng độ thấp nhất là 3.2×10^1 bản sao/phản ứng đối với cả hai tín hiệu OXA-51-like và 16S rRNA. Như thế, độ nhạy kỹ thuật của phản ứng được xác lập ở nồng độ này.

3.4. Thử nghiệm quy trình real-time PCR sử dụng EvaGreen có hai cặp môi (multiplex)

Quy trình real-time PCR sử dụng EvaGreen có hai cặp môi vừa tối ưu ở trên được áp dụng trên 30 mẫu DNA vi khuẩn *A. baumannii* được chọn ngẫu nhiên từ bộ sưu tập mẫu DNA vi khuẩn *A. baumannii*, đang lưu giữ tại Phân môn Sinh học Phân tử, Bộ môn Xét nghiệm, Khoa Điều dưỡng Kỹ thuật Y học, Đại học Y dược TP. HCM. Kết quả phát hiện *A. baumannii* bằng quy trình này cho thấy tương đồng 100% với kết quả trước đó, khi mẫu DNA được phát hiện dương tính với *A. baumannii* bằng kỹ thuật real-time PCR sử dụng mẫu dò Taq-Man.



Hình 6. Kết quả giải trình tự gene OXA-51-like của *A. baumannii*

Một số kết quả dương tính với OXA-51-like được giải trình tự gene cho thấy hoàn toàn trùng khớp với trình tự gene OXA-51-like của *A. baumannii* trên ngân hàng dữ liệu gene của thế giới (NCBI) chứng tỏ khả năng nhân bản chính xác và đặc hiệu của phản ứng.

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng thành công quy trình real-time PCR sử dụng EvaGreen để phát hiện các gene OXA-51-like và 16S rRNA của vi khuẩn *A. Baumannii* với độ nhạy 32 bản sao/phản ứng.

Thành phần hỗn hợp phản ứng real-time PCR đã tối ưu có thành phần gồm 1.5X AptaTaq Fast DNA polymerase (Roche), 200 nM mỗi OXA-51-F/R và 100 nM mỗi 16S-F/R (IDT), 1XEvaGreen (Biotium) và 5µl DNA trong tổng thể tích là 25 µl.

Chương trình nhiệt cho phản ứng real-time PCR: 40 chu kỳ gồm 15 giây - 95°C và 30 giây - 60°C. Chương trình phân tích nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm tương ứng với quá trình tăng nhiệt độ từ 65°C lên 95°C, mỗi bước tăng 0,5°C và lưu trong 20 giây. Tín hiệu được thu nhận với màu huỳnh quang đặc trưng là FAM (510÷530 nm).

Quy trình có thể được ứng dụng để phát hiện nhanh các gene này ở các chủng *A. baumannii* trong lâm sàng và hỗ trợ trong chẩn đoán nhiễm *A. baumannii* ở người bệnh như là một chọn lựa bổ sung bên cạnh quy trình nuôi cấy truyền thống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Thanh Hà, *Phát hiện gen oxacillinase kháng carbapenem của Acinetobacter baumannii phân lập trên các bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết tại Việt Nam*, Hội nghị Khoa học thường niên lần thứ ba của Tổng hội Y học, 2014.
2. Nguyễn Tuấn Anh, Huỳnh Minh Tuấn, Nguyễn Văn Vĩnh Châu, Hồ Huỳnh Thùy Dương. *Xây dựng quy trình EvaGreen real-time PCR phát hiện các gen blaOXA ở Acinetobacter baumannii*, Tạp chí Y học Thành phố, 2014, **18**(5):197-201.
3. Peleg A. Y., Seifert H., Paterson D. L., *Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen*, Clin Microbiol Rev, 2008, **21**(3):82-538.
4. Theaker C., Azadian B., Soni N., *The impact of Acinetobacter baumannii in the intensive care unit*, Anaesthesia, 2003, **58**(3):4-271.
5. Ecker et al., *Identification of Acinetobacter species and genotyping of Acinetobacter baumannii by multilocus PCR and mass spectrometry*, J Clin Microbio., 2006, **144**(8):32-2921.

6. McConnell et al., *Quantitative real-time PCR for detection of Acinetobacter baumannii colonization in the hospital environment*, J Clin Microbio., 2012, **150**(4):4-1412.
7. De Gregorio et al., *Development of a real-time PCR assay for the rapid detection of Acinetobacter baumannii from whole blood samples*, New Microbiol, 2015, **38**(2):7-251.
8. Huang et al., *Development and validation of a multiplex TaqMan real-time PCR for rapid detection of genes encoding four types of class D carbapenemase in Acinetobacter baumannii*, J Med Microbio., 2012, **161**(11):7-1532.

SUMMARY

DETECTION OF INTRINSIC OXA-51-LIKE GENE IN *Acinetobacter baumannii* BY REAL-TIME PCR METHOD

Acinetobacter baumannii is one of leading causes of nosocomial infection. The bacteria possess intrinsic OXA-51-like gene. Moreover, with this gene the bacteria could resist to many antibiotics. The study aims to develop a real-time PCR protocol to detect intrinsic OXA-51-like gene in *A. baumannii*. The real-time PCR has been optimized with DNA-binding dye (EvaGreen) for amplifying OXA-51-like gene specific to *A. baumannii* and 16S rRNA gene specific to *Acinetobacter* spp. in one reaction. The protocol after setup was applied with several *A. baumannii* DNA samples. The result shows that the real-time PCR protocol can correctly detect intrinsic OXA-51-like gene in *A. baumannii* with the sensitivity of 32 copies/reaction and high specificity. The ratio of *A. baumannii* detection reached 100% for DNA samples which *A. baumannii* had been detected. The real-time PCR protocol using EvaGreen to detect OXA-51-like gene in *A. baumannii* has been developed successfully. The protocol can be used to rapidly detect *A. baumannii* based on this gene.

Từ khóa: A. baumannii, carbapenemase, OXA-51, EvaGreen, Real-time PCR.

Nhận bài ngày 30 tháng 8 năm 2016

Hoàn thiện ngày 03 tháng 10 năm 2016

⁽¹⁾ *Chi nhánh phía Nam, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga*

⁽²⁾ *Phân môn Sinh học Phân tử, Bộ môn Xét nghiệm, Khoa Điều dưỡng KTYH, Đại học Y dược TP. HCM.*