

ỨNG DỤNG CÁC KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ CHẨN ĐOÁN BỆNH PHONG VÀ CÁC BỆNH LÂY TRUYỀN QUA ĐƯỜNG TÌNH DỤC TẠI BỆNH VIỆN PHONG - DA LIỄU TRUNG ƯƠNG QUY HOÀ

Nguyễn Phúc Như Hà

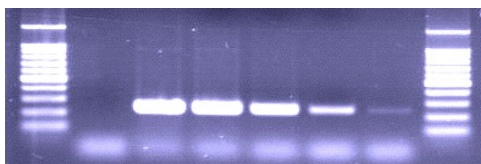
Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử vào thực tế ngày nay đã trở thành công nghệ, đặc biệt là trong ngành y. Sinh học phân tử xâm nhập hầu hết vào tất cả các lĩnh vực, trong đó mạnh nhất là lĩnh vực chẩn đoán, điều trị và phòng ngừa. Việc phát hiện các tác nhân gây bệnh bằng phương pháp sinh học phân tử có nhiều thuận lợi hơn các phương pháp cổ điển. Thứ nhất: tiết kiệm thời gian vì không phải nuôi cấy, thứ hai: Có thể phát hiện các tác nhân không thể nuôi cấy hay khó nuôi cấy như vi khuẩn phong, lao, Chlamydia, các tác nhân ký sinh trùng ngay trên vật chủ trung gian và các tác nhân virus khác. Thứ 3: Các ứng dụng chuyên biệt khác trong lĩnh vực di truyền, miễn dịch, dược lý, vaccin... ở mức phân tử.

Tại bệnh viện Phong-Da liễu TW Quy hoà, ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để phát hiện các tác nhân gây bệnh như Vi khuẩn phong, lao, Chlamydia, lậu cầu khuẩn, HSV, HPV, HIV, HBV và HCV ... Ngoài ra còn có thể định type HPV phân nhóm nguy cơ cao gây ung thư cổ tử cung, định type HSV1-2, Realtime-PCR định lượng và theo dõi điều trị trong nhiễm HBV, HCV... đặc biệt ứng dụng Realtime-PCR thử nghiệm phát hiện đột biến điểm liên quan kháng thuốc trên vi khuẩn phong.

1. Multiplex PCR phát hiện đồng thời Chlamydia và *N.gonorrhoeae*

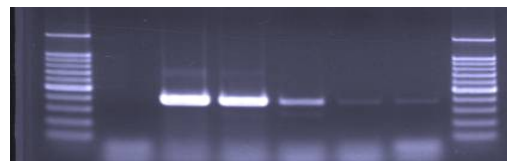
Hiện nay các phương pháp nuôi cấy hay kháng nguyên để chẩn đoán *C. trachomatis* và *N. gonorrhoeae* không đủ nhạy cảm trên các đối tượng nhiễm Chlamydia, nhiễm lậu cầu không triệu chứng hay mạn tính. Do vậy các phương pháp khuếch đại nucleic acide hiện đang rất được quan tâm để áp dụng. Có nhiều phương pháp khuếch đại nucleic acide đã được thương mại hóa như các phương pháp dựa vào kỹ thuật LCR (Abbott), PCR (Roche)⁽¹⁾, TMA (Bayer), hay SDA (BD). Trong các phương pháp này, dễ tiếp cận nhất là phương pháp PCR vì đây là phương pháp mà các nhà nghiên cứu dễ dàng thiết kế nhất và không cần phải bị phụ thuộc vào một hệ thống kín nào. Mục tiêu chính của multiplex PCR là phát hiện được đồng thời cả hai tác nhân *C. trachomatis* và *N. gonorrhoeae* có trong bệnh phẩm lâm sàng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, Multiplex PCR có khả năng phát hiện rất cao, có thể nói là lý tưởng đạt mức phát hiện tối thiểu chỉ cần 1 DNA bộ gen của vi khuẩn đích có mặt trong mẫu thử là có thể phát hiện được. Mẫu thử là các trích biệt DNA từ các huyền dịch vi khuẩn *N. gonorrhoeae* và *C. trachomatis* và mẫu bệnh phẩm lâm sàng như dịch niệu đạo, nước tiểu nam giới, phết cổ tử cung.

Thành phần hỗn hợp PCR phát hiện đồng thời *C. trachomatis* và *N. gonorrhoeae* gồm: Taq polymerase và PCR buffer, dNTP của TaKaRa, mỗi đặc hiệu (đặt TaKaRa tổng hợp) cho đoạn DNA dài 241bp trên cryptic plasmid của *C. trachomatic*, mỗi đặc hiệu cho đoạn DNA dài 390bp trên cryptic plasmid của *N. gonorrhoeae*, thể tích phản ứng là 25 l.



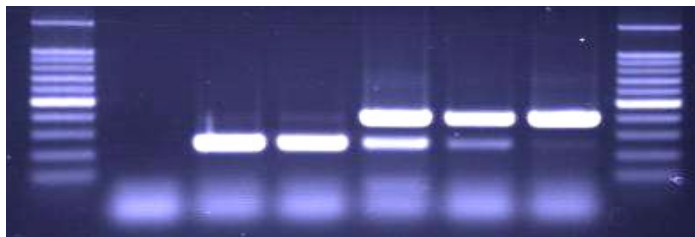
M Neg 1ng 0.1ng 10pg 1pg 0.1pg M

Hình 1: PCR phát hiện *C.trachomatis*



M Neg 1ng 0.1ng 10pg 1pg 0.1pg M

Hình 2: PCR phát hiện *N.gonorrhoeae*



M Neg 0.1pg 1pg 10pg 0.1ng 1ng M 390bp
M Neg 1ng 0.1ng 10pg 1pg 0.1pg M 241bp

N.gonorrhoeae

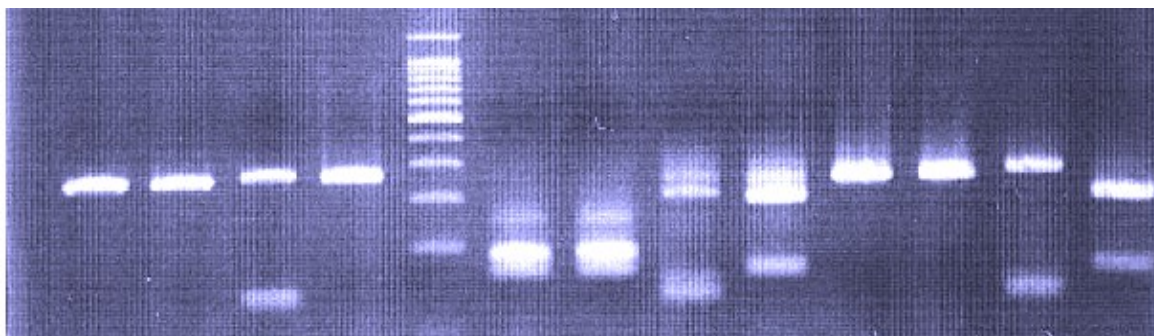
C.trachomatis

Hình 3: Multiplex - PCR phát hiện đồng thời *C.trachomatis* và *N.gonorrhoeae*

Sản phẩm PCR đựng mỗi CM-1 và CM-2 đặc hiệu loài Chlamydia sau đó được cắt tại các điểm có trật tự đặc hiệu khi dùng các enzyme giới hạn (RE) : *AvuI* và *PvuII* thành các đoạn ngắn, có chiều dài đặc hiệu cho từng loài. Enzyme *AluI* cắt sản phẩm PCR của *C.trachomatis* thành 3 đoạn có độ dài 90, 89 và 60bp (giếng 6 & 7); *C.psittaci* thành 2 đoạn 190 và 69bp (giếng 8) ; *C. pneumoniae* thành 2 đoạn 199 và 59bp (giếng 9).

Khác với *AluI*, *PvuII* không cắt sản phẩm PCR của *C.trachomatis* cũng như *C.pneumoniae* (giếng 10, 11 & 13), mà chỉ cắt sản phẩm PCR của *C.psittaci* thành 2 đoạn 189 và 70 bp (giếng 12);

Nhờ vậy có thể phân biệt được các loài Chlamydia khi dùng kỹ thuật RFLP-PCR (Hình 2)



<i>C.tr</i>	<i>C.tra</i>	<i>C.psi</i>	<i>C.pne</i>	<i>M</i>	<i>C.tra</i>	<i>C.tra</i>	<i>C.psi</i>	<i>C.pn</i>	<i>C.tra</i>	<i>C.tra</i>	<i>C.psi</i>	<i>C.pn</i>
<i>a</i>	245	<i>t</i>	<i>u</i>		90	90	190	<i>e</i>	245	245	189	<i>e</i>
245		259	258		89	89	69	199			70	258
								59				66

Hình 4: RFLP-PCR phân biệt loài Chlamydia

Thống kê tại khoa xét nghiệm cho thấy:

20,4% trường hợp PCR- *Chlamydia trachomatis* dương tính trên các tổng số các trường hợp được chẩn đoán mắc lậu cầu.

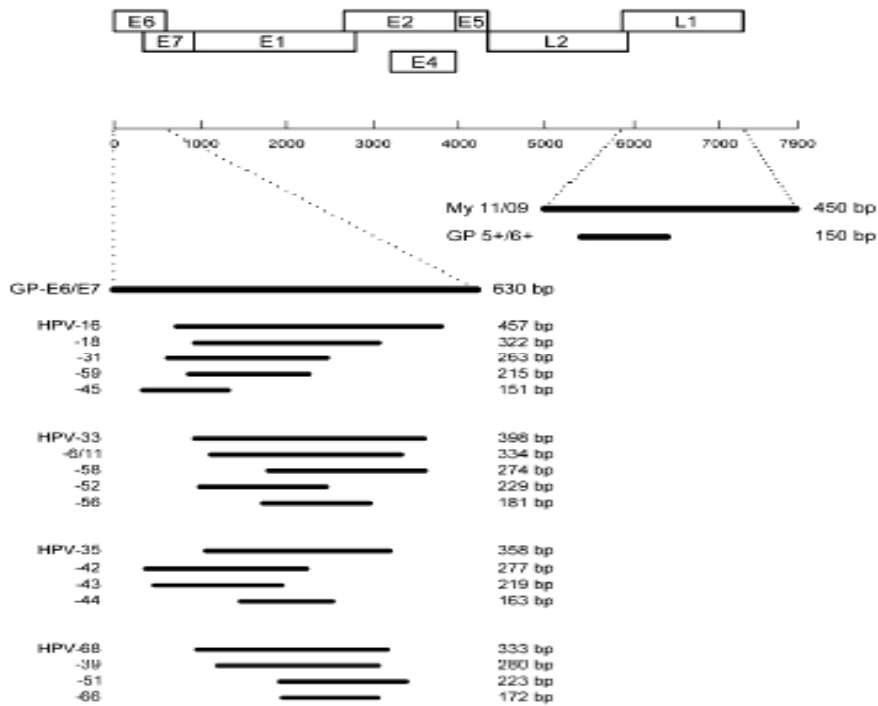
6,8% trường hợp PCR- *Chlamydia trachomatis* dương tính trên các tổng số các trường hợp được chẩn đoán Viêm niệu đạo.

12,1% trường hợp PCR- *Chlamydia trachomatis* dương tính trên các tổng số các trường hợp được chẩn đoán Viêm cổ tử cung.

3. Phát hiện HPV và định type HPV bằng Multiplex-PCR

Ứng dụng từ nhiều nghiên cứu đã được công bố trên thế giới kỹ thuật PCR đã được triển khai thực hiện và áp dụng tại Bệnh viện Phong Da liễu TW Quy hòa để phát hiện và định type HPV .

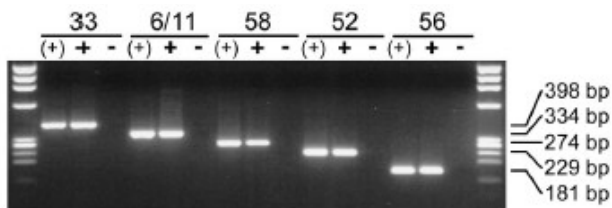
- **PCR đặc hiệu theo nhóm (gs-PCR Group-specific PCR)** phát hiện nhiều type HPV cùng một nhóm. Sử dụng cặp mồi chung (consensus primers) là MY09 và MY11 có trình tự: (5'-GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT- 3') và (5'- GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'), có khả năng khuếch đại đoạn DNA đích có độ dài 450 cặp nucleotid, nằm trên gen L1, L1 là gen cấu trúc nằm trên vỏ capsid của HPV.



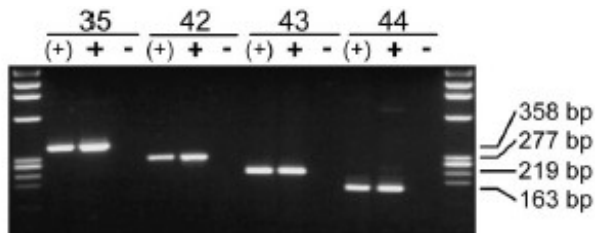
Hình 5: Vị trí các gen L1 và E6/E7 của HPV và độ dài sản phẩm PCR trong phát hiện và định type HPV.

- **PCR đặc hiệu cho từng type HPV (ts-PCR: type specific PCR):** việc định type HPV dựa vào sự khác nhau về trình tự các nucleotid trên gen E6/E7, gen E6/E7 là gen gây ung thư (oncogenes) có khả năng tổng hợp protein gây ung thư, do đó nó có khả năng quyết định tính gây bệnh của virus và chúng có mức độ biến đổi khác nhau.

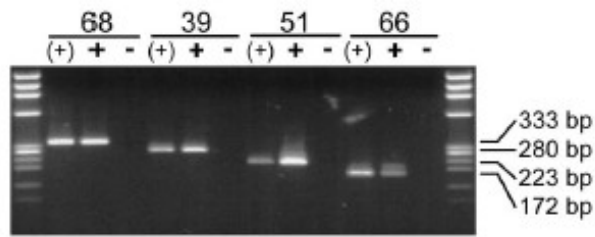
- Sử dụng các cặp mồi đặc hiệu cho từng type bao gồm các type được gọi là nguy cơ cao là: HPV type 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 và 68. Các type được gọi là nguy cơ thấp là: HPV type 6-11, 42, 43 và 44.



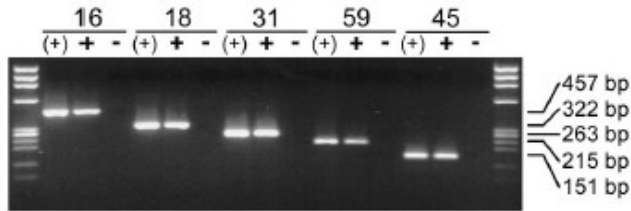
Hình 6: Kết quả ts-PCR định type HPV type 33, 6/11, 58, 52 và 56



Hình 7: Kết quả ts-PCR định type HPV type 35, 42, 43 và 44

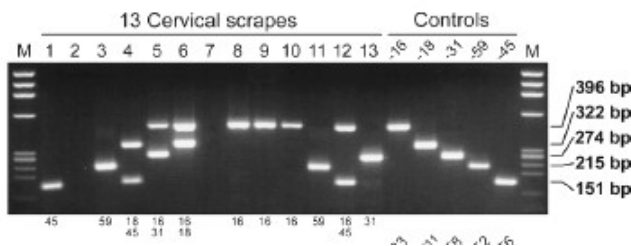


Hình 8: Kết quả ts-PCR định type HPV type 68, 39, 51 và 66



Hình 9: Kết quả ts-PCR định type HPV type 16, 18, 31, 59 và 45

- Kỹ thuật *Nested-Multi PCR (NMPCR)* cũng được ứng dụng, hỗn hợp phản ứng PCR bao gồm đồng thời 3-4 cặp mỗi sao cho sản phẩm PCR có độ dài khác biệt để có thể phân biệt được trên thạch điện di. Kỹ thuật đòi hỏi nghiêm ngặt các điều kiện về nhiệt độ, nồng độ các thành phần của hỗn hợp PCR và việc chọn lựa các cặp mỗi... để phản ứng khuếch đại đặc hiệu có thể xảy ra.



Hình 10: Phát hiện và định type HPV bng kỹ thuật NMPCR

Thống kê tại khoa xét nghiệm Bệnh viện Phong Da liễu Trung ương Quy hoà:

- Có 102/126 mẫu (80%) bệnh phẩm dịch cổ tử cung của bệnh nhân được chẩn đoán “tổn thương tế bào gai mức độ thấp LSIL/HPV” cho kết quả dương tính với PCR-HPV.
- 170/175 (97%) mẫu bệnh phẩm là u sùi sinh dục của bệnh nhân được chẩn đoán sùi mào gà cho kết quả dương tính với PCR-HPV và 100% thuộc type HPV-6/11.
- Lấy ngẫu nhiên 100 mẫu bệnh phẩm là phết cổ tử cung của bệnh nhân STD được chỉ định làm PCR-*Chamydia trachomatis*, có 26/100 (26%) mẫu cho kết quả dương tính với PCR-HPV. Kết quả này phù hợp với nhiều thống kê khác, cho thấy tình hình dịch tế của HPV không chỉ đối với ung thư cổ tử cung mà còn là vấn đề cần thiết phải quan tâm trong các bệnh lây truyền qua đường tình dục.

4. Multiplex-PCR phát hiện và định type HSV

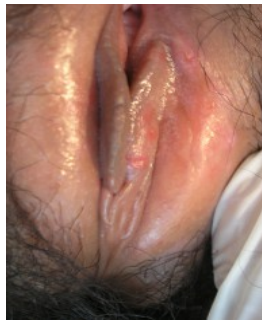
Herpes sinh dục là một bệnh do virus Herpes Simplex HSV₁ và HSV₂ gây nên nhưng chủ yếu là HSV₂. Là bệnh cấp tính lây truyền qua đường tình dục. Bệnh tái phát dai dẳng, người lành mang mầm bệnh và người bệnh kín đáo truyền bệnh cho người khác. Bệnh có triệu chứng hoặc không có triệu chứng. Khi có triệu chứng: đối với Herpes sinh dục nguyên phát. Mụn nước thành chàm ở vị trí tiếp xúc kết hợp đau và viêm hạch bạch huyết. Tuổi mắc bệnh: ở người trẻ đang ở độ tuổi hoạt động tình dục

- Các xét nghiệm như Tzanck smear có thể thấy Tế bào đa nhân khổng lồ.
- HSV-Multiplex-PCR: Sử dụng hỗn hợp 3 primers, cho kết quả dương tính và có thể phân biệt được type1 hay type 2 qua độ dài sản phẩm PCR: HSV-1 có độ dài 503bp và HSV-2 có độ dài 435bp.
- Hoặc HSV - PCR ring biệt cho mỗi type HSV-1 cho sản phẩm 395bp v HSV-2 cho sản phẩm 302bp.

Hình 11: Herpes trước điều trị



Hình 12: Herpes Sau điều trị

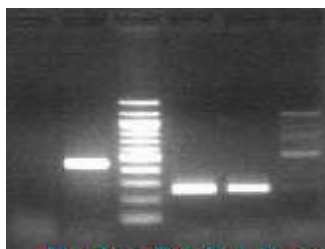


Hình 13: HSV-PCR
PCR xác định và định type HSV1 – HSV2
HSV-1 cho sản phẩm PCR 395 bp
HSV-2 cho sản phẩm PCR 302 bp

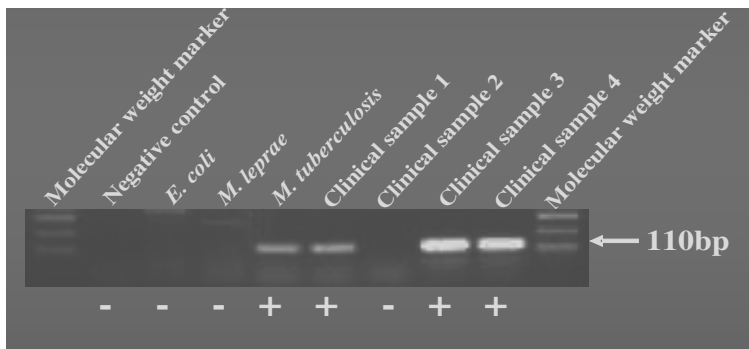


5. PCR phát hiện *M.tuberculosis* trong bệnh phẩm lâm sàng (bao gồm cả các trường hợp lao da).

Kỹ thuật ứng dụng trên tất cả các loại bệnh phẩm lâm sàng như đàm, dịch màng phổi...mà kết quả khảo sát trực tiếp như nhuộm ZN, phương pháp tập trung để tăng mật độ vi khuẩn vẫn không tìm thấy vi khuẩn, hoặc nuôi cấy không mọc, kết quả PCR có khả năng phát hiện và có độ nhạy rất cao.



Hình 14 : Sử dụng bộ kit của Nam khoa, dùng primers Pt18 và INS2 khuếch đại phân đoạn gen IS6110, phát hiện *M.tuberculosis*. Sản phẩm PCR có độ dài 249bp



Hình 15 : Ngoài ra có thể sử dụng bộ mồi IS1 và IS2 phát hiện *M.tuberculosis*. Sản phẩm PCR có độ dài 110bp.

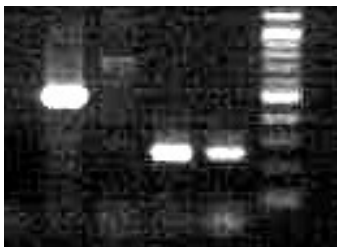


Hình 16 : Hình ảnh lâm sàng của lao da

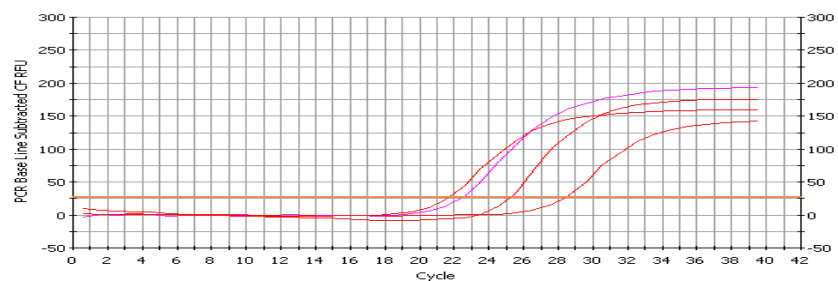
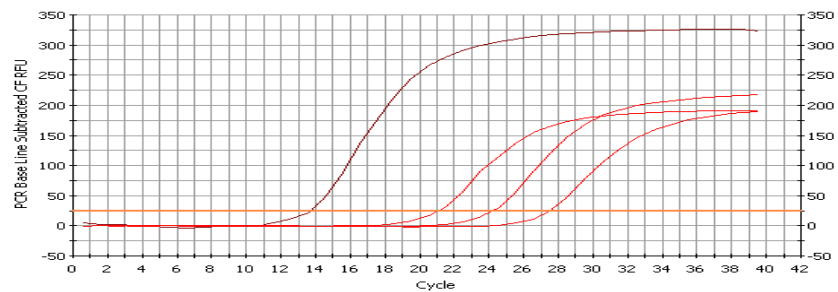
(Các trường hợp tiêu biểu cho kết quả dương tính với TB-PCR)

6. PCR và Realtime-PCR phát hiện và định lượng HBV

Kỹ thuật này ngày nay trở thành một công cụ hữu ích trong chẩn đoán và theo dõi điều trị các trường hợp nhiễm HBV. Một người có xét nghiệm HBsAg dương tính thì cần thiết phải cho chỉ định làm thử nghiệm xác định xem trong máu của người nhiễm có mang HBV hoàn chỉnh hay không bằng **xét nghiệm PCR phát hiện HBV-DNA**, và nếu dương tính thì cần phải biết số lượng HBV hoàn chỉnh có trên 10^5 copies/ml hay không bằng xét nghiệm **Realtime-PCR để định lượng HBV-DNA**. Nếu lượng HBV trong máu dưới 10^5 thì không cần thiết phải điều trị vì HBV vẫn còn nhân bản rất giới hạn trong tế bào gan và chưa gây tổn hại tế bào gan. Nhưng nếu lượng virus $\geq 10^5$ thì cần phải xem xét gan có bị tổn thương chưa thông qua xét nghiệm men gan. Do vậy, sau khi đã bắt đầu điều trị bệnh nhân phải thường xuyên theo dõi hiệu quả điều trị đặc hiệu bằng cách phải định kỳ mỗi 3 tháng cho bệnh nhân làm xét nghiệm định lượng HBV-DNA (nếu lượng HBV-DNA vẫn còn định lượng được) hay PCR định tính phát hiện HBV-DNA (nếu HBV-DNA dưới ngưỡng phát hiện định lượng). Nếu sau một thời gian điều trị đặc hiệu (thường là 3 tháng) mà lượng virus không giảm quá 2 log (100 lần), hay không đạt đến ngưỡng 10^3 /ml, hay trong quá trình điều trị, xét nghiệm HBV-DNA dương tính trở lại, bác sĩ điều trị phải nghĩ đến khả năng virus kháng thuốc, đặc biệt là kháng lamivudine.



HBV-PCR định tính
Sản phẩm có chiều dài
259bp



Hình 17 : Đường biểu diễn quá trình nhân bản DNA theo thời gian của phản ứng Realtime PCR định lượng HBV. Phản ứng tiến hành song song với 3 nồng độ chuẩn để định lượng nồng độ DNA có trong mẫu thử.

7. Realtime-PCR sử dụng Hairpin primer phát hiện điểm đột biến liên quan kháng thuốc DDS, rifapicin và ofloxacin trên vi khuẩn phong

Vi khuẩn phong kháng thuốc DDS, Rifapicin và Ofloxacin do đột biến trên các gen chức năng *folP*, *rpoB* và *gyrA*. Kỹ thuật giải trình tự các nucleotide nhằm xác định các điểm đột biến xảy ra trên các gen này, kỹ thuật ngày nay đã được áp dụng nhiều có đủ tin cậy và chính xác. Tuy nhiên còn có những kỹ thuật khác cũng được thực hiện với mục đích nói trên nhưng đơn giản hơn, nhanh hơn, giá thành rẻ hơn và phù hợp hơn với điều kiện của các phòng thí nghiệm ứng dụng chẩn đoán lâm sàng chưa thể trang bị máy Giải trình tự gen.

Các chủng *M.leprae* kháng thuốc biểu hiện có đột biến trên các gen chức năng: Gen *folP* của *M.leprae* có 2 điểm đột biến: tại vị trí 53 và 55 liên quan kháng DDS. Trên gen *rpoB* đã có đột biến liên

quan kháng Rifampicin xảy ra tại vị trí axit amin 516, một số chủng khác đột biến ở vị trí 526. Cũng có chủng có đột biến tại vị trí 531, chủng khác lại đột biến ở cả hai vị trí 516 và 533. Kháng Ofloxacin do đột biến gen *gyrA* cũng đã được ghi nhận tại vị trí axit amin 91 và 89.

Nghiên cứu này chúng tôi thử nghiệm một phương pháp mới, nhanh, đơn giản và có độ nhạy cao: Kỹ thuật Realtime-PCR sử dụng bộ mồi kẹp tóc (Realtime-PCR using hairpin primers) phát hiện đột biến điểm trên một đoạn gen đích của *M.leprae*, kỹ thuật này dựa trên kỹ thuật ARMS có biến đổi là thay bộ mồi thẳng bằng các bộ mồi kẹp tóc để phát hiện các điểm đột biến (hay các SNP: Single Nucleotide Polymorphism). Realtime-PCR dùng mồi kẹp tóc có khả năng khuếch đại cao hơn, khả năng bắt cặp đặc hiệu hơn, chính xác hơn tại vị trí cần xác định có đột biến hay không đột biến.

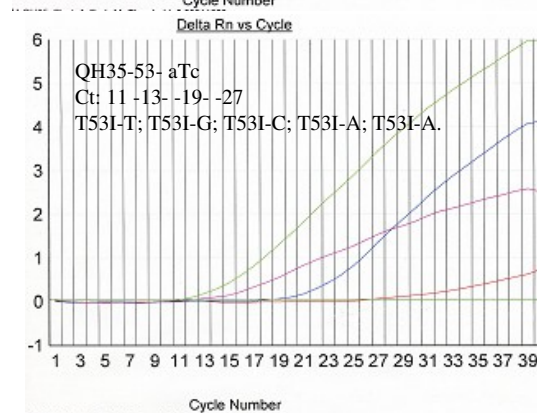
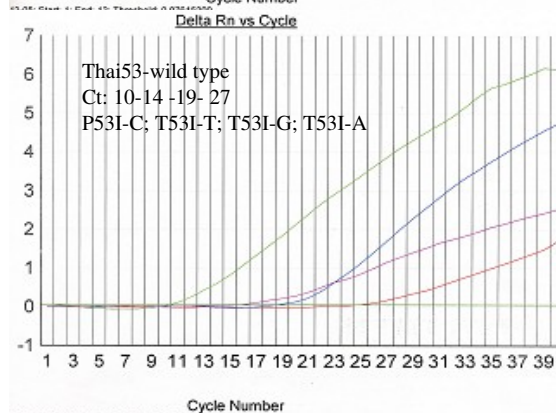
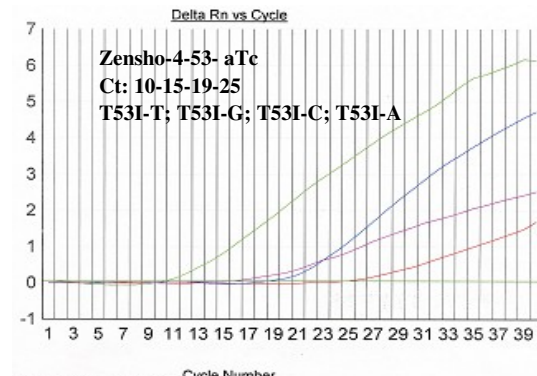
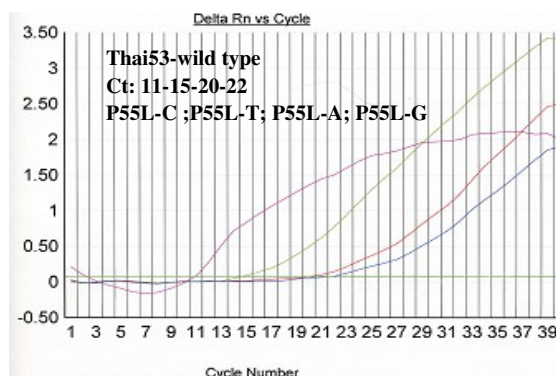
Chúng tôi thiết kế bộ mồi HP cho 2 vị trí 53 và 55 trên gen *folP* của *M.leprea* và áp dụng thử nghiệm cho 6 mẫu có đột biến trên gen *folP* là QH9, QH18, QH35 (đã được xác định bằng kỹ thuật Giải trình tự) và 3 mẫu chứng được cung cấp từ trung tâm nghiên cứu phong Nhật Bản

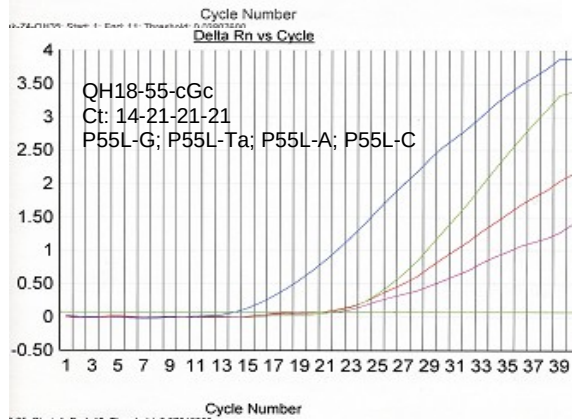
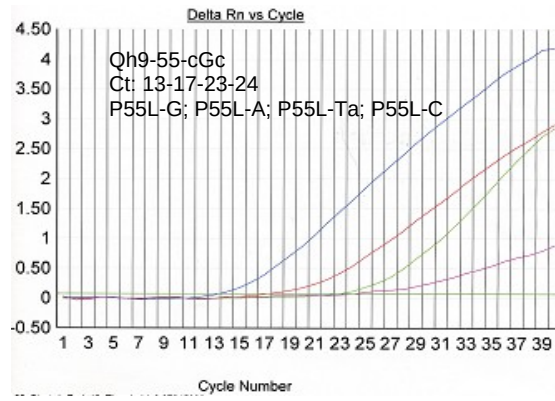
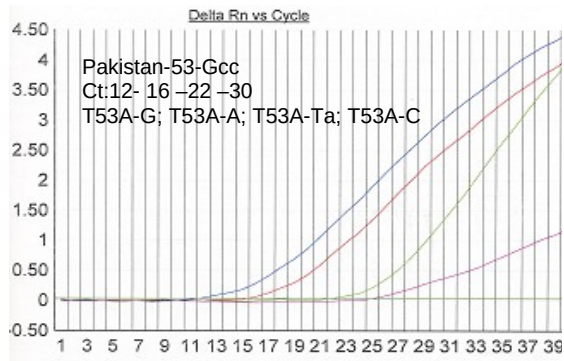
Kết quả cho thấy những giếng chứa HP primer bắt cặp bổ sung hoàn toàn luôn có Chu kỳ ngưỡng (điểm Ct:Threshold Cycle) sớm hơn những giếng chứa các HP primer không tương ứng.

Thử nghiệm cho kết quả tốt ở các với nồng độ 1ng, 0.1ng và 10pg. Tuy nhiên trong quá trình phân tích và đánh giá kỹ thuật chúng tôi nhận thấy ở nồng độ DNA là 0,1ng đã cho kết quả tốt nhất.

Như vậy Realtime-PCR sử dụng mồi kẹp tóc có khả năng phát hiện điểm đột biến liên quan kháng thuốc của vi khuẩn phong.

Trong tương lai gần nghiên cứu cần được áp dụng trên số lượng mẫu lớn để xác định rõ có sự khác nhau có ý nghĩa về độ nhạy, đặc hiệu và tính khả thi khi so sánh với kỹ thuật giải trình tự. Đây mới là những thử nghiệm ban đầu vì vậy chúng tôi chỉ tập trung vào những điểm đột biến (hot pot) đã được cho là có liên quan gây kháng thuốc. Kết quả là giống nhau khi so sánh với PCR- sequencing. Tận dụng khả năng của thử nghiệm này là: đơn giản, nhạy, nhanh chóng và giá thành không cao. Đây là lợi thế cho việc ứng dụng kỹ thuật này trên *M. leprae* cũng như những tác nhân gây bệnh khác ví dụ *M.tuberculosis*.





Biểu đồ 2: Đường biểu diễn độ hấp phụ huỳnh quang của phản ứng khuếch đại của cặp mồi bắt cặp hoàn toàn xuất hiện sớm hơn so với các cặp mồi khác.