

Xây dựng quy trình phát hiện đồng thời *Plasmodium falciparum* và *Plasmodium vivax* dựa trên kỹ thuật recombinase polymerase amplification

Nguyễn Ngọc Bảo Huy^{1,2}, Quan Quốc Đăng³, Nguyễn Hoàng Chương^{2*}

¹Công ty TBR

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

³Trung tâm Phát triển Khoa học và Công nghệ Trẻ, Thành Đoàn TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 26/10/2018; ngày chuyển phản biện 29/10/2018; ngày nhận phản biện 23/11/2018; ngày chấp nhận đăng 30/11/2018

Tóm tắt:

Sốt rét là bệnh nhiễm trùng gây ra bởi các loài ký sinh thuộc chi *Plasmodium*. Ở Việt Nam, bệnh sốt rét chủ yếu do *Plasmodium falciparum* và *Plasmodium vivax* gây ra thông qua trung gian truyền bệnh là muỗi *Anopheles*. Bệnh sốt rét chủ yếu lưu hành tại vùng rừng, đồi núi, ven biển nước lợ ở Việt Nam, nơi mà các phương pháp chẩn đoán bệnh sốt rét khó được tiếp cận. Trong lúc vaccine cho sốt rét chưa được ứng dụng rộng rãi trong thực tế lâm sàng thì việc điều trị bệnh sốt rét phụ thuộc chủ yếu vào các thuốc chống sốt rét, đặc biệt khi bệnh được chẩn đoán ở giai đoạn sớm. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật recombinase polymerase amplification (RPA) được áp dụng nhằm phát triển quy trình xét nghiệm phát hiện đồng thời hai tác nhân chính gây bệnh sốt rét là *P. falciparum* và *P. vivax*. Kết quả nghiên cứu cho thấy: đã thiết kế thành công các cặp mồi đặc hiệu để nhân bản ADN của *P. falciparum* và *P. vivax* trong phản ứng duplex RPA. Tiếp đến, các thông số của phản ứng duplex RPA như nhiệt độ phản ứng và thể tích phản ứng được tối ưu hoá nhằm giảm chi phí, đạt được hiệu quả tốt. Nghiên cứu cũng xây dựng phản ứng lai dựa trên kỹ thuật lateral flow strip với các mồi dò đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax* nhằm giảm thao tác và thời gian tiến hành cũng như nâng cao độ chính xác trong việc phát hiện sản phẩm RPA từ *P. falciparum* và *P. vivax*. Quy trình duplex RPA được ứng dụng để thử nghiệm trên 33 mẫu ADN được tách chiết từ các mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm ký sinh trùng sốt rét và so sánh với quy trình monoplex real-time PCR. Kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* của 2 quy trình này là tương đồng. Quy trình phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* được xây dựng trong nghiên cứu này có khả năng được phát triển thành bộ kit phát hiện nhanh *P. falciparum* và *P. vivax* ứng dụng trong thực tế lâm sàng.

Từ khóa: chẩn đoán phân tử, nhân bản đẳng nhiệt, *Plasmodium*, recombinase polymerase amplification, sốt rét.

Chỉ số phân loại: 3.3

Đặt vấn đề

Sốt rét là bệnh truyền nhiễm do ký sinh trùng thuộc chi *Plasmodium* gây ra [1]. Có hơn 100 loài khác nhau của chi *Plasmodium* nhưng chỉ có 5 loài (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* và *P. Knowlesi*) được biết là gây bệnh ở người. *P. falciparum* được tìm thấy phổ biến ở vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và đặc biệt là châu Phi. *P. vivax* tập trung nhiều và gây bệnh chủ yếu ở châu Á, châu Mỹ La tinh và vài khu vực của châu Phi [2]. Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đến năm 2013, trên toàn thế giới vẫn còn hơn 198 triệu ca mắc bệnh sốt rét và nửa triệu ca tử vong [3]. Bệnh sốt rét ở Việt Nam chủ yếu do 2 loài ký sinh trùng *P. falciparum* (khoảng 55%) và *P. vivax* (khoảng 45%) gây ra. Đây là bệnh lưu hành địa phương, chủ yếu ở vùng rừng, đồi núi, ven biển nước lợ; bệnh xảy ra quanh năm, nhưng chủ yếu vào mùa mưa. Ở Việt Nam, cho đến năm 2015 vẫn còn hơn 14.000

ca mắc bệnh sốt rét và có hơn 6,3 triệu người sống trong vùng có nguy cơ mắc sốt rét cao. Ngoài ra, trong những năm gần đây, hiện tượng ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc ở các vùng sốt rét lưu hành tại Việt Nam ngày càng phổ biến với mức độ kháng ngày càng tăng [4]. Do đó, mỗi người cần phải thực hiện các biện pháp phòng tránh bệnh sốt rét nhằm bảo vệ sức khỏe của bản thân, gia đình, góp phần làm giảm gánh nặng cho xã hội.

Có nhiều phương pháp để chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét như: chẩn đoán lâm sàng, soi kính hiển vi, thử nghiệm miễn dịch (test nhanh), chẩn đoán huyết thanh, kính hiển vi huỳnh quang và các kỹ thuật nhân bản acid nucleic như PCR và nhân bản đẳng nhiệt. Các phương pháp như chẩn đoán lâm sàng, soi kính hiển vi, test nhanh không đòi hỏi nhiều về trang thiết bị nhưng độ nhạy và độ đặc hiệu không cao. Các kỹ thuật nhân bản acid nucleic như PCR có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn nhưng đòi hỏi về trang thiết

*Tác giả liên hệ: Email: nhchuong@hcmus.edu.vn

Constructing a molecular assay based on the recombinase polymerase amplification technique for simultaneous detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*

Ngoc Bao Huy Nguyen^{1,2}, Quoc Dang Quan³,
Hoang Chuong Nguyen^{2*}

¹TBR Company

²University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh City

³Center of Science and Technology Development,
Ho Chi Minh Communist Youth Union

Received 26 October 2018; accepted 30 November 2018

Abstract:

Malaria is an infectious disease caused by *Plasmodium* species. In Vietnam, this disease is mainly caused by *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* through the malaria vector, the *Anopheles* mosquito. Malaria mainly circulates throughout the year in forest, mountainous, and coastal areas in Vietnam where diagnostic methods for this disease are often not easily accessible. Vaccines for malaria have been not available, but malaria medications are effective against the disease especially when malaria is diagnosed at the early stage. In this study, we developed a molecular assay based on the recombinase polymerase amplification (RPA) technique to detect *P. falciparum* and *P. vivax* in clinical samples. We successfully designed the specific primers to amplify the DNA of these two *Plasmodium* species in the duplex RPA reaction. Reaction temperature and reaction volume of the duplex RPA reaction were studied to reduce the operating cost. We also set up the hybridisation reaction with the specific *P. falciparum* and *P. vivax* probes based on the lateral flow strip technique to detect the RPA products. This hybridisation technique reduced manipulation and timing as well as improved the accuracy in the detection of *P. falciparum* and *P. vivax* by RPA. Finally, we evaluated the built molecular assay to detect *P. falciparum* and *P. vivax* on 33 DNA samples collected from malaria patients in comparison with the monoplex real-time PCR assay. The results of the two assays were identical. The duplex RPA assay could be developed into a quick test kit for the rapid and accuracy detection of *P. falciparum* and *P. vivax* in the treatment of malaria in Vietnam.

Keywords: isothermal duplication, malaria, molecular diagnosis, *Plasmodium*, recombinase polymerase amplification.

Classification number: 3.3

bị cũng như kỹ thuật viên có kinh nghiệm. Do đó, việc phát triển một phương pháp đơn giản hơn nhưng lại cho độ nhạy và độ đặc hiệu cao để chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét là hết sức cần thiết. PRA là phương pháp nhân bản ADN đẳng nhiệt ở nhiệt độ từ 37-42°C và trong thời gian khoảng 5-20 phút. Recombinase, SSB và polymerase là 3 protein đóng vai trò quan trọng trong phản ứng RPA. Recombinase và SSB sẽ giúp gắn mỗi và trình tự ADN mục tiêu. Sau đó, mỗi sẽ được kéo dài nhờ polymerase. Đây là một kỹ thuật khuếch đại acid nucleic nên cho độ nhạy và độ đặc hiệu cao như PCR. RPA có thể sử dụng cho xác định bệnh và phát hiện đa hình nucleotide đơn ở ung thư của người và sinh vật biến đổi gen [5]. Ngoài ra, RPA cũng có thể được ứng dụng trong kiểm tra vi sinh trong mẫu nước, thực phẩm và trong lĩnh vực trồng trọt, chăn nuôi. Do chỉ cần hoạt động ở nhiệt độ thấp nên RPA có khả năng ứng dụng cao trong chẩn đoán tại hiện trường hoặc các điểm chăm sóc sức khỏe. Ở Việt Nam, *P. falciparum* và *P. vivax* là hai ký sinh trùng sốt rét gây bệnh phổ biến và với đặc điểm chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét càng sớm và chính xác thì việc điều trị bệnh sốt rét càng hiệu quả, chúng tôi thực hiện nghiên cứu xây dựng một quy trình phát hiện đồng thời *P. falciparum* và *P. vivax* dựa trên kỹ thuật duplex RPA với mong muốn đóng góp một công cụ vào việc kiểm soát hiệu quả bệnh sốt rét ở Việt Nam.

Đối tượng và phương pháp

Vật liệu

Các mẫu ADN tách chiết từ *P. falciparum* và *P. vivax* được nuôi cấy nhân tạo và các mẫu ADN tách chiết từ các mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm ký sinh trùng sốt rét được cung cấp bởi Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng TP Hồ Chí Minh. Các môi và mẫu dò được tổng hợp và cung cấp bởi Công ty Integrated ADN Technologies. Các hóa chất thực hiện phản ứng RPA được cung cấp bởi Công ty TwistDX. Các hóa chất cho phản ứng lateral flow strip được cung cấp bởi Công ty Milenia Biotec. Các hóa chất thực hiện phản ứng real-time PCR được cung cấp bởi Công ty Biorline. Các hóa chất điện di trên gel agarose được cung cấp bởi Công ty Biorline và Công ty TBR.

Thiết kế môi và mẫu dò phát hiện đặc hiệu *P. falciparum* và *P. vivax*

Vùng gen 18S rRNA của *Plasmodium* được lựa chọn để thiết kế các môi và mẫu dò đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax*. Tất cả các trình tự gen 18S rRNA của *P. falciparum* và *P. vivax* (JQ627149.1, JQ627149.1, JQ627149.1, JQ627149.1, JQ627149.1, JQ627149.1, JQ627149.1, JQ627149.1) được tải về từ GenBank. Sau đó, các vùng gen này được so sánh bằng phần mềm Clustal X để tìm ra các đoạn bảo tồn. Trên các đoạn bảo tồn này, một môi ngược chung và hai môi xuôi đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax* được thiết kế sử dụng phần mềm Annyb. Ngoài ra, mẫu dò đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax* cũng được thiết kế theo cách tương tự. Đặc tính kỹ thuật của các môi và mẫu dò được kiểm tra bằng phần mềm OligoAnalyzer. Tính đặc hiệu lý thuyết của các môi và mẫu dò được khảo sát với phần mềm Blast. Trình tự các môi và mẫu dò được gửi tổng hợp tại Công ty Integrated ADN Technologies.

Thiết lập phản ứng RPA và phát hiện sản phẩm RPA bằng kỹ thuật điện di

Phản ứng RPA được thiết lập trong tube thể tích 0,2 ml bao gồm các thành phần: 29,5 µl rehydration buffer; 2,5 µl magnesium acetate, 2 µl mỗi môi (RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF) có nồng độ 10 mM/môi; 2,5 µl ADN bản mẫu; nước cất vừa đủ 50 µl. Phản ứng RPA được ủ ở 37°C trong 40 phút. Sau khi kết thúc phản ứng, cho 100 µl phenol pH 8 vào trong tube 0,2 ml. Vortex và ly tâm 11.000 vòng/phút trong 2 phút. Thu dịch nổi để điện di trên gel agarose.

Khảo sát nhiệt độ và thể tích phản ứng duplex RPA

Nhiệt độ phản ứng: phản ứng RPA được thiết lập như trên và được ủ ở các nhiệt độ 25, 30, 35, 40°C để khảo sát khoảng nhiệt độ mà phản ứng duplex RPA có khả năng diễn ra.

Thể tích phản ứng: phản ứng RPA được thiết lập với đầy đủ các thành phần như trên nhưng với các thể tích phản ứng khác nhau, bao gồm 10, 20, 30, 40, 50 µl để khảo sát thể tích phản ứng nhỏ nhất vẫn cho kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax*.

Thiết lập phản ứng RPA và phát hiện sản phẩm RPA bằng kỹ thuật lateral flow strip

Phản ứng RPA được thiết lập trong tube thể tích 0,2 ml bao gồm các thành phần: 29,5 µl rehydration buffer; 2,5 µl magnesium acetate, 2 µl mỗi môi (RPA.PlasR, RPA.Falci-BIO, RPA.Vivax-DIG) có nồng độ 10 µM/môi; 0,6 µl mẫu dò RPA.Plas-FAM có nồng độ 10 µM; 2,5 µl ADN bản mẫu; nước cất vừa đủ 50 µl. Phản ứng RPA được ủ ở 37°C trong 40 phút. Sau khi kết thúc phản ứng, sử dụng 2 µl sản phẩm RPA phát hiện bằng lateral flow strip. 2 µl sản phẩm RPA của *P. falciparum* và *P. vivax* được trộn với dung dịch PBST running buffer (bộ kit Milenia Genline Hybridetect-2 kit), sau đó rút 10 µl của dung dịch này cho lên vị trí nạp mẫu của que giấy. Trên que giấy chứa 3 vị trí tương ứng với vạch tín hiệu chứng nội, vạch tín hiệu cho *P. falciparum* và vạch tín hiệu cho *P. vivax*. Cuối cùng, cho que giấy này vào tube chứa 200 µl dung dịch PBST running buffer mới và quan sát kết quả hiện màu của hạt nano vàng sau 2-5 phút ở ba vị trí của chứng nội, *P. falciparum* và *P. vivax*.

Thiết lập phản ứng real-time PCR

Phản ứng monoplex real-time PCR được thiết lập trong tube 0,2 ml bao gồm các thành phần: 10 µl SensiFast™ Probe Lo-ROX Mix 2X; 1 µl mỗi môi (Plas-R, Falc-F, Vivax-F) với nồng độ 10 µM/môi; 0,25 µl mỗi mẫu dò (Falc-P, Vivax-P) với nồng độ 10 µM/mẫu dò; 2,5 µl ADN bản mẫu; nước cất vừa đủ thể tích 20 µl. Chương trình real-time PCR: 1 chu kỳ 3 phút ở 95°C; 40 chu kỳ 95°C trong 10 giây và 60°C trong 50 giây. Kết quả real-time PCR được phân tích sử dụng phần mềm của máy ABI 7500.

Phương pháp giải trình tự nucleotide Sanger

Các sản phẩm RPA từ *P. falciparum* và *P. vivax* được tinh sạch bằng bộ kit Expin PCR SV (GenAll). Sau đó, các sản phẩm này được đánh dấu huỳnh quang bằng phản ứng PCR với bộ kit BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing (ThermoFisher). Tiếp đến, các sản phẩm đánh dấu huỳnh quang được phân tích trên máy giải trình tự tự động ABI 3500. Các trình tự giải mã được xử lý bằng phần mềm Sequencing Analysis Software v5.4 with KB™

Basecaller v1.4.1, sau đó được phân tích và so sánh với trình tự chuẩn trên GenBank bằng phần mềm BioEdit.

Kết quả

Thiết kế các môi và mẫu dò đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax*

Trình tự các môi và mẫu dò sử dụng trong nghiên cứu này được trình bày trong bảng 1.

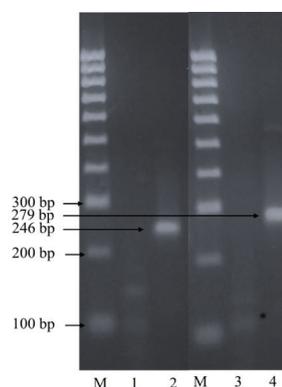
Bảng 1. Trình tự các môi và mẫu dò được thiết kế trong nghiên cứu.

STT	Tên	Trình tự nucleotide	Ghi chú
1	RPA.PlasR	CCC AAG CTA CTC CTA TTA ATC GTA ACT AAG CCA	Tự thiết kế. Môi ngược chung
2	RPA.FalciF	CGC TTT AAT ACG CTT CCT CTA TTA TTA TGT TC	Tự thiết kế. Kết hợp với RPA.PlasR tạo sản phẩm 246 bp
3	RPA.VivaxF	GCA ACG CTT CTA GCT TAA TCC ACA TAA CTG AT	Tự thiết kế. Kết hợp với RPA.PlasR tạo sản phẩm 279 bp
4	RPA.Plas-FAM	FAM-TGC TWT AWC TGT TTG CTT TGA ACA CTC TAA (THF) TTA CTC AAA GTA ACA A-Block	Tự thiết kế. Phát hiện các sản phẩm RPA bằng phản ứng lai
5	RPA.Falci-BIO	Biotin-CGC TTT AAT ACG CTT CCT CTA TTA TTA TGT TC	Tự thiết kế. Kết hợp với RPA.PlasR tạo sản phẩm 246 bp
6	RPA.Vivax-DIG	Digoxigenin-GCA ACG CTT CTA GCT TAA TCC ACA TAA CTG ATA C	Tự thiết kế. Kết hợp với RPA.PlasR tạo sản phẩm 279 bp
7	Plas-R	AACCCAAAGACTTTGATTCTCATAA	Các môi và mẫu dò sử dụng cho real-time PCR được tham khảo công trình của Rougemont và cộng sự (2004)
8	Falci-F	CCGACTAGGTGTGGATGAAAGTGTAA	
9	Vivax-F	CCGACTAGGCTTTGGATGAAAGATTITA	
10	Falci-P	FAM-AGC AAT CTA AAA GTC ACC TC G AAA GAT GAC T-TAMRA	
11	Vivax-P	VIC-AGC AAT CTA AGA ATA AAC TC C GAA GAG AAA ATT CT-TAMRA	

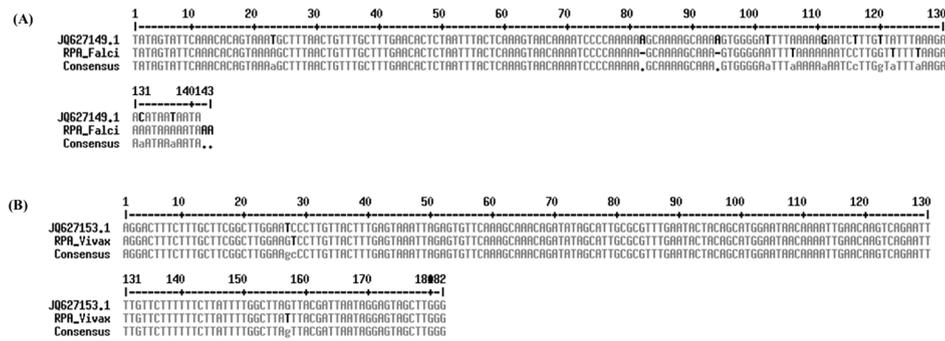
Tất cả các môi và mẫu dò đã thiết kế được kiểm tra các đặc tính kỹ thuật bằng các phần mềm thích hợp nhằm đảm bảo có khả năng hoạt động tốt trong phản ứng RPA và phản ứng lai. Kết quả kiểm tra cho thấy, các môi và mẫu dò đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax* đã thiết kế đạt yêu cầu về mặt lý thuyết. Các môi và mẫu dò này sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Xây dựng phản ứng RPA nhằm phát hiện *P. falciparum*, *P. vivax*

Phản ứng monoplex RPA được thiết lập cho *P. falciparum*, *P. vivax* với các môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF để khảo sát hoạt động thực tế của các môi đã thiết kế. Kết quả điện di trên gel agarose của các phản ứng monoplex RPA được trình bày trong hình 1.



Hình 1. Kết quả monoplex RPA trên ADN của *P. falciparum* và *P. vivax*. M: thang ADN 100 bp; 1, 2: monoplex RPA với cặp môi PlasR-FalciF trên mẫu chứng âm và ADN của *P. falciparum*. 3, 4: monoplex RPA với cặp môi PlasR-VivaxF trên mẫu chứng âm và ADN của *P. vivax*.

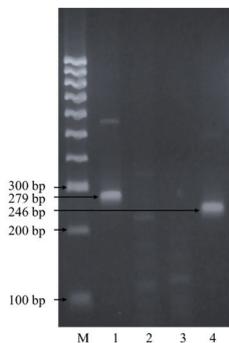


Hình 2. Kết quả so sánh trình tự nucleotide giữa các sản phẩm RPA lần lượt của *P. falciparum* (A), *P. vivax* (B) với các trình tự chuẩn trên GenBank.

Kết quả ở hình 1 cho thấy, các phản ứng monoplex RPA với các cặp môi đặc hiệu cho *P. falciparum*, *P. vivax* đã nhân bản hiệu quả ADN của *P. falciparum*, *P. vivax*. Các sản phẩm RPA của *P. falciparum*, *P. vivax* có kích thước như dự kiến lần lượt là 246 và 279 bp khi so sánh với thang ADN 100 bp. Để chứng minh các sản phẩm RPA từ các cặp môi là đặc hiệu cho *P. falciparum*, *P. vivax*, các sản phẩm này được giải trình tự nucleotide bằng kỹ thuật Sanger và so sánh với các trình tự của *P. falciparum*, *P. vivax* trên ngân hàng dữ liệu GenBank. Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu của sản phẩm RPA được trình bày trong hình 2.

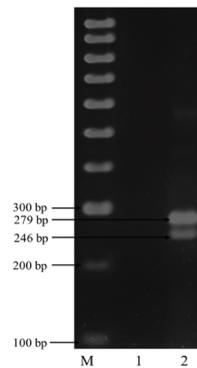
Kết quả so sánh cho thấy, trình tự nucleotide của các sản phẩm RPA từ *P. falciparum*, *P. vivax* hoàn toàn trùng khớp với các trình tự chuẩn trên GenBank là JQ627149.1 cho *P. falciparum* và JQ627153.1 cho *P. vivax*. Để chứng minh các môi đã thiết kế không nhân bản chéo ADN của *P. falciparum* và *P. vivax*, phản ứng RPA với 3 môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF được thiết lập trên ADN lần lượt của *P. falciparum* và *P. vivax*. Kết quả kiểm tra khả năng nhân bản chéo của môi được trình bày trong hình 3.

Kết quả ở hình 3 cho thấy, phản ứng RPA với 3 môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF trên ADN của *P. falciparum* chỉ cho một băng sản phẩm với kích thước 246 bp khi so sánh với thang ADN 100 bp. Tương tự, phản ứng RPA với 3 môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF trên ADN của *P. vivax* chỉ cho một băng sản phẩm với kích thước 279 bp. Như vậy, môi RPA.FalciF kết hợp với môi RPA.PlasR chỉ nhân bản ADN *P. falciparum* và môi RPA.VivaxF kết hợp với môi RPA.PlasR chỉ nhân bản ADN của *P.*



Hình 3. Kết quả kiểm tra chéo của các môi cho *P. falciparum* và *P. vivax*. M: thang ADN 100 bp; 1, 2: phản ứng RPA với 3 môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF trên ADN của *P. falciparum* và mẫu chứng âm; 3, 4: phản ứng RPA với 3 môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF trên ADN của *P. vivax* và mẫu chứng âm.

vivax. Các kết quả nhân bản bằng RPA, giải trình tự nucleotide sản phẩm, kiểm tra nhân bản chéo của các môi RPA.FalciF và RPA.VivaxF đã chứng minh các môi thiết kế trong nghiên cứu này hoạt động hiệu quả và đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax*. Với các môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF, chúng tôi thiết lập phản ứng duplex RPA nhằm phát hiện đồng thời *P. falciparum* và *P. vivax* trong cùng một phản ứng. Kết quả duplex PCR được trình bày ở hình 4.

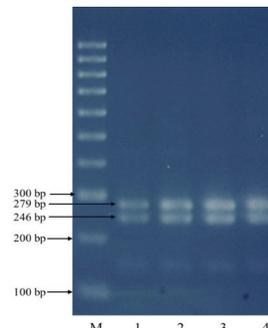


Hình 4. Kết quả duplex RPA nhằm phát hiện đồng thời *P. falciparum* và *P. vivax*. M: thang ADN 100 bp; 1: mẫu chứng âm phản ứng duplex RPA với các môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF trên bản mẫu là nước; 2: phản ứng duplex RPA với các môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF trên ADN của *P. falciparum* và *P. Vivax*.

Kết quả ở hình 4 cho thấy, phản ứng duplex RPA trên ADN của *P. falciparum* và *P. vivax* cho các băng sản phẩm mục tiêu là 246 và 279 bp khi so sánh với thang ADN 100 bp trong khi mẫu chứng âm không cho các băng mục tiêu này. Các điều kiện của phản ứng duplex RPA này sẽ được khảo sát trong các thí nghiệm tiếp theo nhằm tìm ra thông số tốt nhất.

Khảo sát các điều kiện của phản ứng duplex RPA phát hiện đồng thời *P. falciparum* và *P. vivax*

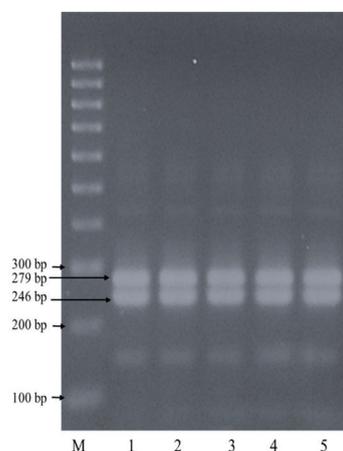
Khảo sát nhiệt độ phản ứng: mục tiêu của nghiên cứu này là hướng đến ứng dụng phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* tại các điểm chăm sóc sức khỏe ban đầu, nơi thiếu thốn các trang thiết bị so với phòng thí nghiệm. Do đó, bên cạnh nhiệt độ phản ứng RPA theo khuyến cáo là 37°C, chúng tôi khảo sát hiệu quả của phản ứng duplex RPA tại các nhiệt độ khác nhau, bao gồm 25, 30, 35, 40°C. Kết quả khảo sát nhiệt độ của phản ứng RPA được trình bày ở hình 5.



Hình 5. Kết quả khảo sát nhiệt độ của phản ứng duplex RPA. M: thang ADN 100 bp; 1-4: phản ứng duplex RPA tại các nhiệt độ lần lượt là 25, 30, 35, 40°C.

Kết quả ở hình 5 cho thấy, phản ứng duplex RPA diễn ra trong khoảng nhiệt độ rộng từ 25-40°C, tuy nhiên tín hiệu RPA tốt nhất nằm trong khoảng từ 35-40°C. Vì thế, chúng tôi chọn nhiệt độ 37°C là nhiệt độ cho phản ứng duplex RPA phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax*. Nhiệt độ này cũng thích hợp để tiến hành quy trình duplex RPA tại các nơi thiếu thôn trang thiết bị.

Khảo sát thể tích phản ứng: với mục tiêu tiết kiệm chi phí phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* bằng RPA khi phương pháp này được ứng dụng trong thực tế lâm sàng, chúng tôi khảo sát các thể tích phản ứng khác nhau đi từ 50 µl (theo khuyến cáo của bộ kit RPA) xuống đến 10 µl, cụ thể bao gồm các thể tích như sau: 10, 20, 30, 40, 50 µl. Kết quả khảo sát thể tích phản ứng RPA được trình bày ở hình 6. Kết quả khảo sát thể tích phản ứng RPA cho thấy, không có sự chênh lệch trong khả năng phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* bằng phản ứng RPA với các thể tích phản ứng khác nhau. Vì vậy, thể tích phản ứng RPA có thể giảm xuống đến 10 µl để tiết kiệm chi phí phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax*.

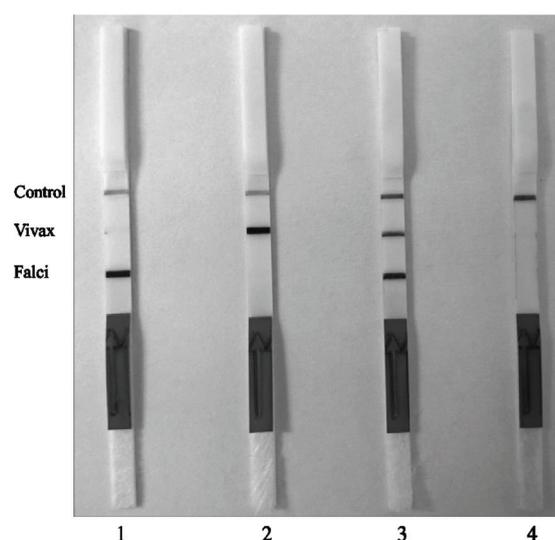


Hình 6. Kết quả khảo sát thể tích phản ứng RPA. M: thang ADN 100 bp; 1-5: thể tích phản ứng RPA lần lượt là 10, 20, 30, 40, 50 µl.

Phát hiện sản phẩm RPA bằng kỹ thuật lateral flow strip

Khi điện di trên gel agarose các sản phẩm RPA từ *P. falciparum* và *P. vivax*, các băng ký sinh khác ngoài hai băng sản phẩm mục tiêu của *P. falciparum* và *P. vivax* vẫn xuất hiện. Chúng tôi đã khảo sát các điều kiện của phản ứng như nồng độ môi, thời gian phản ứng, nồng độ magnesium acetate (kết quả không trình bày) nhưng vẫn không loại bỏ hoàn toàn các băng ký sinh này. Đây là lý do chúng tôi xây dựng phản ứng lai với mẫu dò đặc hiệu là RPA.Plas-FAM cho *P. falciparum* và *P. vivax* dựa trên kỹ thuật lateral flow strip nhằm phát hiện chính xác *P. falciparum* và *P. vivax*. Trong phản ứng duplex RPA cho lateral flow strip, chúng tôi thay thế môi RPA.FalciF bằng RPA.Falci-BIO và môi RPA.VivaxF bằng RPA.Vivax-DIG. Cả hai môi thay thế có các gốc chức năng là Biotin và Digoxigenin. Trên que giấy (strip) của bộ kit Milenia Genline Hybridetect-2 có sẵn kháng thể bắt giữ Biotin và Digoxigenin tại hai vị trí khác nhau tương ứng cho sản phẩm RPA của *P. falciparum*

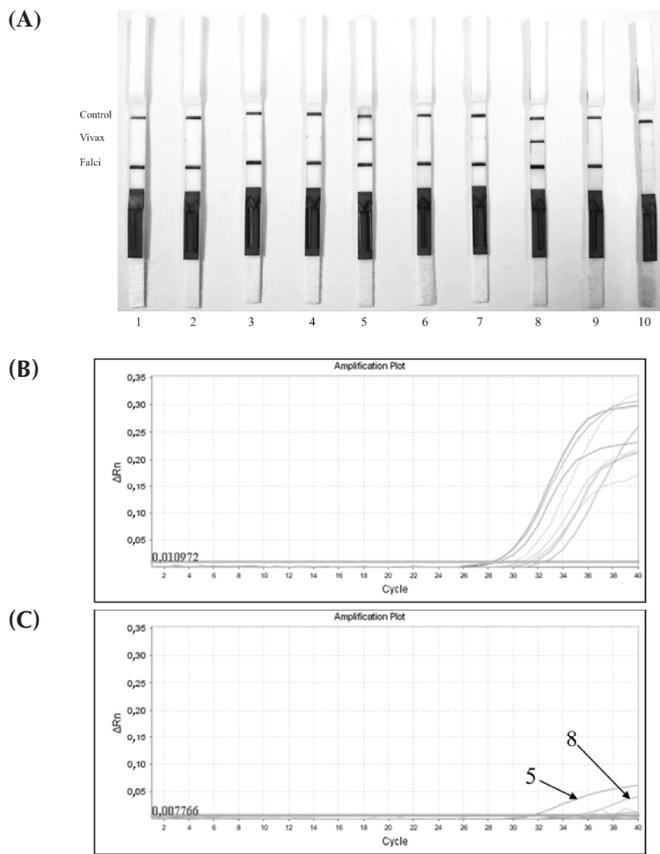
và *P. vivax*. Ngoài ra, trên que giấy còn có một vị trí tín hiệu chứng nội cho quá trình lai. Sản phẩm RPA được phát hiện bằng kháng thể đặc hiệu có gắn hạt nano vàng cho gốc chức năng FAM trên mẫu dò RPA.Plas-FAM. Kết quả lateral flow strip được trình bày ở hình 7. Kết quả hình 7 cho thấy, phản ứng duplex RPA kết hợp lateral flow strip cho tín hiệu dương tính với sản phẩm RPA từ ADN *P. falciparum*, từ ADN *P. vivax* và từ cả hai loại ADN của *P. falciparum* và *P. vivax* tại các vị trí đã xác định trước. Mẫu chứng âm chỉ có tín hiệu chứng nội của phản ứng lai. Các tín hiệu lai trên các que giấy là rõ ràng và không có các tín hiệu ký sinh khác. Vì vậy, chúng tôi sẽ sử dụng phương pháp lai lateral flow strip thay cho điện di trên gel agarose cho quy trình phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* bằng kỹ thuật RPA.



Hình 7. Kết quả lai bằng kỹ thuật lateral flow strip trên các sản phẩm RPA. 1: phản ứng lai với sản phẩm RPA của *P. falciparum*; 2: phản ứng lai với sản phẩm RPA của *P. vivax*; 3: phản ứng lai với sản phẩm RPA của *P. falciparum* và *P. vivax*; 4: phản ứng lai với sản phẩm RPA từ mẫu chứng âm.

Đánh giá quy trình duplex RPA trên các mẫu ADN nghi nhiễm *P. falciparum* và *P. vivax*

Chúng tôi thu nhận 33 mẫu ADN tách chiết từ các bệnh nhân nghi nhiễm ký sinh thuộc chi *Plasmodium* từ Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng TP Hồ Chí Minh và thực hiện quy trình duplex RPA nhằm phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* trong các mẫu ADN này. Chúng tôi cũng thực hiện quy trình monoplex real-time PCR với các mẫu dò Taqman đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax* nhằm so sánh với kết quả phát hiện bằng quy trình duplex RPA. Các mẫu dò Taqman probe cho các phản ứng monoplex real-time PCR được tham khảo từ công trình của Rougemont và cộng sự năm 2004. Kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* bằng cả hai quy trình được trình bày đại diện trong hình 8 và trình bày đầy đủ trong bảng 2.



Hình 8. Kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* bằng quy trình duplex RPA và real-time PCR. (A) duplex RPA; (B) real-time PCR với môi và mẫu dò đặc hiệu *P. falciparum*; (C) real-time PCR với môi và mẫu dò đặc hiệu *P. vivax*.

Hình 8 cho thấy kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* trên 9 mẫu ADN nghi nhiễm ký sinh thuộc chi *Plasmodium* bằng quy trình duplex RPA và real-time PCR. Quy trình duplex RPA phát hiện *P. falciparum* ở cả 9 mẫu ADN và phát hiện *P. vivax* ở 2 mẫu ADN (số 5 và số 8 trong hình 8). Kết quả phát hiện bằng real-time PCR khẳng định kết quả duplex RPA khi phát hiện cả 9 mẫu ADN có nhiễm *P. falciparum* và 2 mẫu ADN (số 5 và số 8) nhiễm *P. vivax*.

Bảng 2. Kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* bằng duplex RPA và real-time PCR.

Mẫu ADN	Mẫu phát hiện bằng duplex RPA	Mẫu phát hiện bằng real-Real-time PCR
Nhiễm <i>P. falciparum</i>	1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 15, 16, 20, 21, 22	1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 15, 16, 20, 21, 22
Nhiễm <i>P. vivax</i>	13	13
Nhiễm <i>P. falciparum</i> và <i>P. vivax</i>	5, 8, 11, 12, 14, 17, 18, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33	5, 8, 11, 12, 14, 17, 18, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33
Mẫu âm tính		

Bảng 2 cho thấy, kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* là trùng hợp giữa hai quy trình duplex RPA và real-time PCR.

Bàn luận

P. falciparum và *P. vivax* là hai ký sinh trùng gây bệnh sốt rét chủ yếu ở Việt Nam. Do đặc thù bệnh xuất hiện chủ yếu ở vùng rừng, đồi núi nên công tác chẩn đoán còn gặp nhiều khó khăn. Việc tìm kiếm một kỹ thuật sinh học phân tử không đòi hỏi nhiều về trang thiết bị là cần thiết cho chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét. Trong các kỹ thuật sinh học phân tử được phát triển gần đây, RPA là một kỹ thuật có khả năng ứng dụng cao trong chẩn đoán, có thể khuếch đại ở nhiệt độ phòng, chỉ trong 10 phút và đọc kết quả chỉ trong 5 phút bằng lateral flow strip. Đây là một trong những phương pháp có khả năng ứng dụng rất tốt cho chẩn đoán, đặc biệt là chẩn đoán tại hiện trường. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm ứng dụng kỹ thuật RPA trong việc phát hiện *P. falciparum* và *P. Vivax*, phục vụ cho việc điều trị hiệu quả bệnh sốt rét ở Việt Nam. Đây cũng là công trình nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam ứng dụng kỹ thuật RPA trong chẩn đoán.

RPA là một kỹ thuật cho phép nhân bản ADN ở nhiệt độ thấp và đẳng nhiệt bằng cách sử dụng các enzyme trong hệ thống sửa sai và sao chép của tế bào sinh vật. Ở giai đoạn khởi động nhân bản ADN mục tiêu, các môi sẽ được enzyme recombinase (RecA) gắn vào tạo thành sợi nucleoprotein. Sợi nucleoprotein này sẽ dò trên trình tự ADN mục tiêu để tìm kiếm cấu trúc tương đồng. Khi cấu trúc tương đồng được tìm thấy, sợi nucleoprotein này sẽ xâm lấn ADN mục tiêu mạch đôi và hình thành một cấu trúc D-loop. Đây là vị trí phân tách sợi ADN mạch đôi. Mạch bổ sung được tách ra sẽ được ổn định bởi protein SSB để giúp hạn chế việc mạch bổ sung tự bắt cặp lại với mạch mục tiêu. Trong khi đó, sau khi bắt cặp với mạch mục tiêu, các SSB protein rời khỏi trình tự môi, điều này giúp cho enzyme polymerase gắn vào được phức hợp môi - mạch mục tiêu và tiến hành tổng hợp mạch bổ sung. Kết quả là có hai phân tử ADN giống hệt phân tử ADN ban đầu được hình thành sau một chu kỳ hoạt động của RecA, protein SSB và enzyme polymerase. Hai phân tử ADN này tiếp tục làm cơ chất để hệ protein RecA, protein SSB và enzyme polymerase tổng hợp các phân tử ADN mới ở các chu kỳ kế tiếp [5, 6].

Các môi cho phản ứng RPA như RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF được thiết kế dựa vào nguyên tắc của kỹ thuật RPA như có độ dài từ 20-35 nucleotide, %GC nằm trong khoảng 30-70%, các cấu trúc thứ cấp có năng lượng tự do nhỏ hơn -9 kcal/mol, trình tự môi đặc hiệu cho sinh vật mục tiêu [7, 8]. Lưu ý, môi RPA.Falci-BIO có trình tự nucleotide trùng hợp với môi RPA.FalciF và tương tự cho môi RPA.Vivax-DIG với môi RPA.VivaxF. Điểm khác biệt giữa hai môi RPA.FalciF và RPA.VivaxF với hai môi RPA.Falci-BIO và RPA.Vivax-DIG là các gốc chức năng Biotin và Digixigenin, hai gốc chức năng này sẽ được sử dụng trong phản ứng lai lateral flow strip. Tương tự, mẫu dò RPA.Plas-FAM cũng được thiết kế đặc hiệu với *P. falciparum* và *P. vivax* và có các cấu trúc thứ cấp với năng lượng tự do nhỏ hơn -9 kcal/mol. Các cấu trúc thứ cấp của một môi hay mẫu dò có năng lượng tự do nhỏ hơn -9 kcal/mol sẽ không bền ở nhiệt độ phản ứng và vì thế không cản trở môi hay mẫu dò bắt cặp vào ADN mục tiêu trong phản

ứng nhân bản và phản ứng lai [9]. Khi khảo sát hoạt động thực tế trong phản ứng RPA với ADN tách chiết từ *P. falciparum* và *P. vivax* nuôi cấy, các môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF đã cho các sản phẩm nhân bản với kích thước dự kiến là 246 và 279 bp. Kết quả giải trình tự nucleotide Sanger đã xác nhận các sản phẩm nhân bản từ các môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF có nguồn gốc từ *P. falciparum* và *P. vivax*. Ngoài ra, kết quả kiểm tra khả năng nhân bản chéo cũng cho thấy các môi đã thiết kế là RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF chỉ nhân bản chọn lọc *P. falciparum* và *P. vivax*. Vì vậy, các môi đã thiết kế cho phản ứng RPA là hoàn toàn đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax* và hoạt động tốt trong phản ứng RPA trên thực tế.

Để tiết kiệm chi phí hóa chất cũng như giảm thao tác, chúng tôi đã xây dựng và khảo sát một số điều kiện của quy trình duplex RPA phát hiện đồng thời *P. falciparum* và *P. vivax*. Kết quả cho thấy có khả năng phát hiện cùng lúc hai ký sinh thuộc chi *Plasmodium* bằng phản ứng RPA với 3 môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF. Phản ứng duplex RPA có khả năng diễn ra ở nhiệt độ từ 25 đến 40°C và thể tích phản ứng RPA có thể giảm xuống còn 10 µl. Các thông số này cho phép tiến hành phản ứng RPA ở những nơi thiết yếu trang thiết bị thí nghiệm. Ngoài ra, chúng tôi cũng khảo sát phản ứng lai với mẫu dò đặc hiệu dựa trên kỹ thuật lateral flow strip. Đây là bước quan trọng nhất của quy trình duplex RPA để được ứng dụng trong thực tế lâm sàng vì nó giảm được thao tác và thời gian phát hiện sản phẩm RPA mục tiêu so với kỹ thuật điện di trên gel agarose. Thời gian tiến hành phản ứng lai chỉ diễn ra trong khoảng 5 phút với thao tác nhúng que giấy vào dung dịch lai và xem kết quả trực tiếp bằng mắt thường. Để so sánh, kỹ thuật điện di trên gel agarose phát hiện các sản phẩm RPA cần hơn 120 phút với các thao tác chuẩn bị bản gel, điện di sản phẩm trên bản gel, nhuộm và giải nhuộm bản gel, quan sát kết quả trên bản đèn tử ngoại. Hơn nữa, phát hiện sản phẩm RPA bằng kỹ thuật lateral flow strip còn tăng tính chính xác vì sử dụng thêm một mẫu dò đặc hiệu trong phản ứng lai. Mẫu dò này chỉ bắt cặp với sản phẩm RPA mục tiêu và không bắt cặp với các sản phẩm RPA ký sinh có trong phản ứng RPA. Trên thực tế, thường có sự xuất hiện của các sản phẩm RPA ký sinh bên cạnh sản phẩm RPA mục tiêu khi điện di sản phẩm từ phản ứng RPA trên gel agarose mặc dù các điều kiện của phản ứng RPA như nồng độ môi, thời gian phản ứng đã được khảo sát để tối ưu. Tuy nhiên, các sản phẩm ký sinh này đã được loại bỏ hoàn toàn trong phản ứng lai lateral flow strip với các mẫu dò đặc hiệu. Như vậy, với quá trình xây dựng và khảo sát đã đề cập ở trên thì quy trình duplex RPA trong nghiên cứu này có khả năng được sử dụng để phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* ở những điểm y tế thiếu thốn các trang bị.

Cuối cùng, quy trình duplex RPA vừa xây dựng được đánh giá trên các mẫu ADN được tách chiết từ máu của những bệnh nhân nghi nhiễm ký sinh trùng thuộc chi *Plasmodium* ở Việt Nam và được thực hiện song song quy trình monoplex real-time PCR với cùng các môi PlasR, FalciF, VivaxF và các Taqman probe đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax* được trích từ công trình nghiên cứu của Rougemont và cộng sự năm 2004 [10]. Kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* ở các mẫu ADN nghi nhiễm ký sinh trùng thuộc chi *Plasmodium* là trùng khớp giữa hai quy trình duplex RPA và monoplex real-time PCR. Với những kết quả thu nhận

được thì nghiên cứu này là tiền đề tốt để tiếp tục phát triển quy trình duplex RPA thành bộ kit phát hiện nhanh *P. falciparum* và *P. vivax* phục vụ cho việc điều trị bệnh sốt rét trong thực tế lâm sàng.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình nhằm phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* dựa trên kỹ thuật duplex RPA và lateral flow strip. Các môi và mẫu dò đã thiết kế trong phản ứng duplex RPA hoàn toàn đặc hiệu và nhân bản hiệu quả ADN của *P. falciparum* và *P. vivax*. Phản ứng duplex RPA có khả năng diễn ra ở dây nhiệt độ từ 25-40°C và thể tích phản ứng có thể giảm xuống đến 10 µl. Các sản phẩm RPA từ *P. falciparum* và *P. vivax* được phát hiện bằng kỹ thuật lateral flow strip với mẫu dò đặc hiệu, điều này làm giảm thao tác và thời gian tiến hành cũng như nâng cao độ chính xác. Khi đánh giá quy trình duplex RPA trên 33 mẫu ADN nghi nhiễm ký sinh thuộc chi *Plasmodium*, quy trình duplex RPA đã cho kết quả tương đồng với quy trình monoplex real-time PCR. Kết quả nghiên cứu này là tiền đề tốt để phát triển thành bộ kit phát hiện nhanh *P. falciparum* và *P. vivax* phục vụ cho việc điều trị bệnh sốt rét ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng TP Hồ Chí Minh đã cung cấp các mẫu ADN tách chiết từ *P. falciparum* và *P. vivax* nuôi cấy và từ các mẫu máu bệnh nhân nghi nhiễm ký sinh thuộc chi *Plasmodium*. Chúng tôi cũng cảm ơn Công ty TBR đã tài trợ các hóa chất, vật liệu sử dụng trong nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N. Tangpukdee, C. Duangdee, P. Wilairatana, S. Krudsood (2009), "Malaria diagnosis: a brief review", *The Korean Journal of Parasitology*, **47(2)**, pp.93-102.
- [2] J.H. Kattenberg, A. Erhart, M.H. Truong, E. Rovira-Vallbona, K.A.D. Vu, T.H.N. Nguyen, V.H. Nguyen, V.V. Nguyen, M. Bannister-Tyrrell, M. Theisen, A. Bennet, A.A. Lover, T.D. Tran, X.X. Nguyen, A. Rosanas-Urgell (2018), "Characterization of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* recent exposure in an area of significantly decreased transmission intensity in Central Vietnam", *Malaria Journal*, **17(1)**, DOI: 10.1186/s12936-018-2326-1.
- [3] World Health Organization (2015), *World Malaria Report 2014*.
- [4] <http://vncdc.gov.vn/vi/danh-muc-benh-truyen-nhiem/1093/benh-sot-ret>.
- [5] R.K. Daher, G. Stewart, M. Boissinot, M.G. Bergeron (2016), "PRA for diagnostic applications", *Clinical Chemistry*, **62(7)**, pp.947-958.
- [6] O. Piepenburg, C.H. Williams, D.L. Stemple, N.A. Armes (2006), "ADN detection using recombination proteins", *PLoS Biology*, **4(7)**, p.e204, DOI:10.1371/journal.pbio.0040204.
- [7] <https://www.twistdx.co.uk/docs/default-source/twistamp-manuals/twistamp-assay-design-manual-v2-4.pdf?sfvrsn=10>.
- [8] <https://www.twistdx.co.uk/en/tpa/using-pcr-primers>.
- [9] <https://www.idtADN.com/pages/support/faqs/how-do-i-use-the-oligoanalyzer-tool-to-analyze-possible-hairpins-and-dimers-formed-by-my-oligo>.
- [10] M. Rougemont, M. Van Saanen, R. Sahli, H.P. Hinrikson, J. Bille, K. Jaton (2004), "Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays", *Journal of Clinical Microbiology*, **42(12)**, pp.5636-5643.