

XÂY DỰNG QUY TRÌNH REAL-TIME RT-PCR XÁC ĐỊNH MRNA VI KHUẨN LAO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Hồ Thị Thanh Thủy¹, Phạm Thảo Nguyên²,
Nguyễn Phan Thành³, Huỳnh Xuân Linh⁴, Lê Huyền Ái Thúy^{4*}

TÓM TẮT

Hiện nay, việc đánh giá hiệu quả điều trị vi khuẩn lao chủ yếu dựa vào phương pháp nuôi cấy. Chính tốc độ mọc rất chậm của *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) làm ảnh hưởng đến ý nghĩa sử dụng kết quả này trong lâm sàng. Chính vì vậy, một phương pháp phát hiện nhanh chóng, chính xác để phát hiện sự đáp ứng của vi khuẩn lao với thuốc điều trị là rất cần thiết.

Chúng tôi vừa xây dựng quy trình realtime RT-PCR sử dụng mẫu dò thủy giải Taqman trên mRNA đích antigen 85B (α antigen). Bước đầu, quy trình vừa xây dựng được sử dụng, kết hợp với nhuộm soi đàm và Realtime PCR dựa trên DNA đích IS6110 và 16SrRNA gen, thử nghiệm trên 30 mẫu bệnh phẩm đàm thu nhận từ các bệnh nhân lao đang trong quá trình điều trị. Có 8 mẫu cho kết quả âm tính hoàn toàn đối với cả ba phương pháp. Phương pháp vừa mới xây dựng phát hiện 9 trong tổng số 22 mẫu dương phát hiện bằng Realtime PCR. Có thể kết luận về 9 trường hợp dương tính với Real-time RT-PCR là trong mẫu bệnh phẩm vẫn còn vi khuẩn lao sống và dự đoán bệnh nhân chưa đáp ứng tốt với phác đồ điều trị. Mặt khác, phương pháp Real-time PCR cho kết quả dương tính nhiều hơn Real-time RT-PCR 13 trường hợp. Có thể thấy rằng Real-time PCR không phân biệt được vi khuẩn lao sống hay chết. Quy trình Real-time RT-PCR hoàn toàn có thể sử dụng nhằm theo dõi hiệu quả của quá trình điều trị bệnh lao.

ABSTRACT

Current laboratory methods for monitoring the response to therapy for tuberculosis (TB) rely on mycobacterial culture. Their clinical usefulness is therefore limited by the slow growth rate of *Mycobacterium tuberculosis*. Rapid methods to reliably quantify the response to anti-TB drugs are desirable.

We have developed a Real-time RT-PCR assay that uses hydrolysis probes to target mRNA for α antigen.

Initially, this Real-time RT-PCR protocol has been used, combined with standard Ziehl-Neelsen staining technique and Real-time PCR based on 16SrRNA gene and IS6110 as targets, on 30 samples obtained from patients who are in the process of treatment.

There are 8 sputum samples showing completely negative results for all three methods. This Real-time RT-PCR assay found 9 out of 22 positive samples detected by Real-time PCR. It can be concluded on 9 cases positive for Real-time RT-PCR still remaining viable MTB bacteria in those samples and may predict that those patients do not respond well to MTB treatment. On the other hand, Real-time PCR method showed a high false-positive rate, more than 13 cases. This Real-time RT-PCR assay may allow rapid monitoring of the response to anti-MTB therapy.

¹Công ty cổ phần Việt Á

²Bộ môn Công nghệ Sinh học Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP. HCM

³Bộ môn Công nghệ Sinh học Trường Đại học Nông lâm TP. HCM

⁴Phó trưởng Khoa Công nghệ Sinh học Trường Đại học Mở TP. HCM

^{4*}Tác giả chịu trách nhiệm chính; Email: thuy.lha@ou.edu.vn. Mobile: 0905784471

Mở đầu

Lao là một bệnh nhiễm khuẩn do vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis*) gây nên. Bệnh lao có thể gặp ở tất cả các bộ phận của cơ thể, trong đó lao phổi là thể lao phổ biến nhất (chiếm 80 – 85%) và là nguồn lây chính cho người xung quanh [1]. Tính đến thời điểm tháng 7 năm 2006, Việt Nam được WHO xếp thứ 13 trong 22 nước có số lượng bệnh nhân lao cao nhất thế giới, trong khu vực Tây Thái Bình Dương, Việt Nam đứng thứ 3, sau Trung Quốc và Philippin [2]. Đến năm 2008, theo báo cáo của WHO, Việt Nam có tỷ lệ bệnh nhân tái phát và điều trị thất bại tăng (năm 2004 là 6,4% ; năm 2008 là 7,7%), đặc biệt bệnh lao đang xuất hiện và có xu hướng tăng của các chủng vi khuẩn lao kháng thuốc và đa kháng thuốc [2, 3].

Hiện nay, việc đánh giá hiệu quả điều trị vi khuẩn lao chủ yếu dựa vào phương pháp nuôi cấy. Chính tốc độ mọc rất chậm của *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) làm ảnh hưởng đến ý nghĩa sử dụng kết quả này trong lâm sàng. Kết quả nuôi cấy bệnh phẩm đàm chuyển từ dương tính sang âm tính trong **tuần đầu tiên đến hết tháng thứ nhất** trong quá trình điều trị được xem là chỉ định tốt nhất của điều trị thành công [4]. Những phác đồ điều trị hiệu quả làm giảm một cách nhanh chóng số lượng vi khuẩn sống trong bệnh phẩm đàm, thông thường xấp xỉ 10 lần trong vòng 1-2 tuần đầu tiên [5]. Chính vì vậy, một phương pháp phát hiện nhanh chóng, chính xác và nhạy với giá cả thấp để phát hiện vi khuẩn lao sống là rất cần thiết. So với rRNA và DNA bộ gen, mRNA duy trì half-life của nó rất ngắn. Chính vì vậy, các kỹ thuật sử dụng mRNA làm đích phản ánh một cách chính xác nhất hiện trạng vi khuẩn sống và cũng là phương thức phù hợp nhất để đánh giá hiệu quả điều trị bệnh lao [6, 7, 8].

Kháng nguyên 85B là một trong ba kháng nguyên của phức hợp kháng nguyên 85 (bao gồm: 85A-32 kD, 85B-30 kD, 85C-

32 kD), hiện diện gần như ở tất cả các loài *Mycobacteria* được phân tích cho đến nay. Kháng nguyên này là một protein ngoại bào có kích thước lớn và là một trong số các protein được tổng hợp nhiều nhất ở vi khuẩn lao được nuôi cấy trên môi trường nhân tạo hay trong cơ thể người [9, 10]. Thông qua việc phân tích các gen mã hóa phức hợp kháng nguyên 85 và các mRNA của các gen này cho thấy: các gen được sắp xếp như các đơn vị phiên mã riêng biệt, sự khác biệt trong trình tự các gen mã hóa phức hợp protein 85 giữa *M. tuberculosis* với các chủng *Mycobacteria* khác là khoảng 82-90% (*M. kansasii* 90%, *M. intracellulare* 84%, *M. aivum* 83%, *M. leprae* 82%) [11, 12]. Đối với kháng nguyên 85B, gen mã hóa cho kháng nguyên này có chiều dài 987 bp (định vị từ nucleotide thứ 2.134.890 đến nucleotide thứ 2.135.867 – theo NCBI, mã số truy cập – accession number: NC_000962).

Trong chẩn đoán bệnh lao bằng kỹ thuật sinh học phân tử, người ta thường chọn trình tự đích là một trong hai vùng *IS6110* (DNA) và *16S* (rRNA hoặc DNA) [10, 11]. Đối với hai trình tự *IS6110* và *16S*, chúng có half-life dài nên khi vi khuẩn lao đã chết chúng vẫn còn tồn tại trong tế bào chủ, làm sai lệch kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp này, trình tự mRNA có half-life ngắn (thường mất ngay sau quá trình dịch mã) nên khi vi khuẩn lao chết cũng đồng nghĩa với việc không có sự hiện diện của mRNA. Hellyer và ctv (1999) [12] đã tiến hành thí nghiệm so sánh hàm lượng của ba loại trình tự DNA (dựa vào *IS6110*), rRNA (*16S rRNA*), mRNA (*α antigen*) này trên vi khuẩn lao được nuôi cấy trên ba loại môi trường: môi trường nuôi cấy Dubos broth, Dubos broth có bổ sung kháng sinh isoniazid và Dubos broth có bổ sung kháng sinh rifampin. Kết quả cho thấy, hàm lượng hai loại trình tự DNA-*IS6110* và rRNA-*16S* thay đổi không đáng kể giữa môi trường có bổ sung thuốc kháng lao và môi trường không có bổ sung thuốc. Trong khi đó, hàm

lượng mRNA- α *antigen* có sự sụt giảm lớn so sánh giữa môi trường không và có bổ sung thuốc. Điều này cũng đồng thời chứng minh tính hiệu quả của việc sử dụng mRNA làm trình tự đích nhằm đánh giá hiệu quả của thuốc điều trị thông qua vi khuẩn lao còn sống hay đã chết.

Nghiên cứu này được đặt ra nhằm xây dựng quy trình Real-time RT-PCR sử dụng *Taqman* probe trên mRNA đích là α *antigen*. Bước đầu, quy trình vừa xây dựng được sử dụng, kết hợp với nhuộm soi đàm và Real-time PCR dựa trên DNA đích *IS6110*, thử nghiệm trên 30 mẫu bệnh phẩm đàm thu nhận từ các bệnh nhân lao đang trong quá trình điều trị.

Nguyên liệu và phương pháp

Chủng vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* (MTB).

Các chủng MTB do bệnh viện Lao Trung ương cung cấp.

Mẫu bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm đàm nghi nhiễm vi khuẩn lao do Bệnh Viện Đa Khoa Hòa Thành, Bệnh viện Lao và Bệnh Phổi tỉnh Tây Ninh cung cấp. Mẫu đã được xét nghiệm bằng phương pháp nhuộm soi đàm. Mẫu được chuyển đến và xử lý tại công ty Việt Á, đồng thời kiểm tra sự hiện diện của vi khuẩn lao bằng Real-time PCR.

Môi & mẫu dò

Cặp môi và mẫu dò nhằm phát hiện α *antigen* của vi khuẩn lao được thiết kế như sau: trình tự của gen α *antigen* từ bốn loài vi khuẩn lao gây bệnh trên người được thu thập từ ngân hàng gen NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Các phần mềm sử dụng bao gồm Primer3, Clustal X 1.81 (EMBL, Châu Âu), Annhyb – 4.922, năm 2004 (Olivier Friard, Hoa kỳ), phần mềm trực tuyến BLAST (NCBI, Hoa Kỳ) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> và Oligo Analyzer 3.0 (IDT, Hoa kỳ) <http://scitools.idtdna.com/scitools/Applications/OligoAnalyzer/>. Trình tự môi và mẫu dò, trong đó MTBF6 là môi

xuôi, MTBR6 là môi ngược và MTBP5 là mẫu dò với chất phát huỳnh quang FAM và chất dập tắt huỳnh quang TAMRA, như sau:

MTBF6: 5'-GGATCTGCTGCGTAGGGTCGTT-3'

MTBR6: 5'-GGTTACAAGGCCGCAGACATGT-3'

MTBP5: 5'-TCGAGTGACCCGGCATGGGAGCG-3'

Tách chiết acid nucleic

Acid nucleic từ mẫu đàm bệnh nhân sau khi được xử lý bằng phosphate buffer và mucolytic solution kết hợp với N-Acetyl-L-Cystein, sẽ được ly trích bằng phương pháp sử dụng phenol/chloroform, phỏng theo phương pháp của Chomczynski & Sacchi (1987): 100 μ l huyết thanh được thêm vào 900 μ l Trizol, pH4 (đối với tách RNA) và pH8 (đối với tách DNA). Acid nucleic sau đó được rửa bằng Isopropanol với chất trợ rửa seedDNA. Acid nucleic thu được sau rửa được giữ trong dung dịch TE 1X (Tris-EDTA) (đối với DNA) và H₂O cất đã qua xử lý bằng DEPC (đối với RNA) và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Real-time PCR và Real-time-RT-PCR

Phản ứng được thực hiện trên máy Mxpro-Mx3005P (Stratagene) với chương trình nhiệt bao gồm 95°C- 5' (1 chu kỳ) và 40 chu kỳ lặp lại với 95°C- 15'', 60°C- 1' cho Real-time PCR và 25°C- 5' (1 chu kỳ), 42°C- 30' (1 chu kỳ), 85°C- 5' (1 chu kỳ) và 95°C- 5' (1 chu kỳ) và 40 chu kỳ lặp lại với 95°C- 15'', 60°C- 1' cho Real-time RT-PCR. Thê tích hỗn hợp phản ứng Real-time PCR là 50 μ l bao gồm: 1 $\times$ dung dịch đệm PCR, 100 nmol/L môi và mẫu dò, 400 μ mol/L mỗi loại dATP, dGTP, dCTP và dTTP, 1.5 units hot-start Taq DNA polymerase, 3 mmol/L MgCl₂. Thê tích hỗn hợp phản ứng RT là 20 μ l bao gồm: 1 $\times$ dung dịch đệm RT, 20 units RNase Inhibitor, 0,2 μ g Random hexamer, 200 units M-MuLV Reverse Transcriptase và 100 ng - 5 μ g total RNA.

Giải trình tự

Sản phẩm PCR α *antigen* được gửi đến công ty Macrogen, Hàn quốc để tinh sạch và giải trình tự.

KẾT QUẢ & THẢO LUẬN

Kết quả khảo sát hệ môi, mẫu dò trên lý thuyết.

Kết quả khảo sát các đặc tính vật lý.

Chương trình Oligo Analyzer 3.0 trực tuyến trên trang web của IDT <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) được sử dụng để kiểm tra các đặc tính của môi xuôi, môi ngược và mẫu dò. Kết quả kiểm tra được trình bày trong bảng 1.

Về các đặc tính chiều dài, %GC, Tm, ΔG của cấu trúc kẹp tóc của hệ môi-mẫu dò vừa thiết kế đều thỏa mãn các yêu cầu trong việc thiết kế môi và mẫu dò. Riêng một số giá trị ΔG của cấu trúc self-dimer và hetero-dimer tuy có nhỏ hơn -9 kcal.mole⁻¹, nhưng do cả môi và mẫu dò đều có giá trị Tm cao – có thể phá vỡ các cấu trúc thứ cấp này, nên không ảnh hưởng nhiều đến phản ứng PCR và điều này sẽ được kiểm chứng lại trong thực nghiệm.

Bảng 1: Các đặc tính vật lý của môi, mẫu dò

Oligonucleotide	Chiều dài	%GC	Tm (°C)	(1)	(2)	(3)	
MTBF6	22	59,1	61,3	-0,49	-4,62	-10.3	MTBR6
MTBR6	22	54,5	60	0,1	-9,28	-9.82	MTBP5
MTBP5	23	69,6	67,5	-3,2	-9,75	-9.06	MTBF6

Tm: nhiệt độ biến tính, (1): ΔG của cấu trúc kẹp tóc (hairpin-loop) (kcal.mole⁻¹), (2): ΔG của cấu trúc self-dimer (kcal.mole⁻¹), (3): ΔG của cấu trúc hetero-dimer (kcal.mole⁻¹)

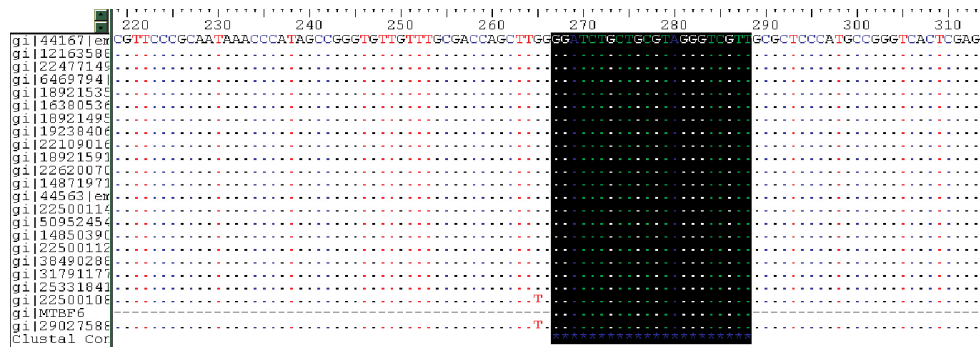
Kết quả khảo sát độ đặc hiệu

Khảo sát độ đặc hiệu của hệ môi-mẫu dò được thực hiện trước hết bằng công cụ BLAST trên trang web của NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Với việc sử dụng lần lượt các trình tự môi hay mẫu dò là “input”, kết quả BLAST cho thấy độ tương đồng trên 90% ghi nhận được với các trình tự out-put là các trình tự của nhóm vi khuẩn gây bệnh lao, đặc biệt tính tương đồng tuyệt đối đạt ở cả đầu 5’ và 3’ của môi và mẫu dò (dữ liệu không trình bày). Đối với các trình tự của các loài khác, kết quả BLAST cho thấy cặp môi và mẫu dò có độ tương đồng trong khoảng 60%, tuy nhiên sự bắt cặp là không hoàn toàn ở cả hai đầu 5’ và 3’ với bất kỳ trình tự nào (dữ liệu không trình bày). Việc bắt cặp hoàn toàn ở đầu chỉ xảy ra với các loài *Helicobacter hepaticus*,

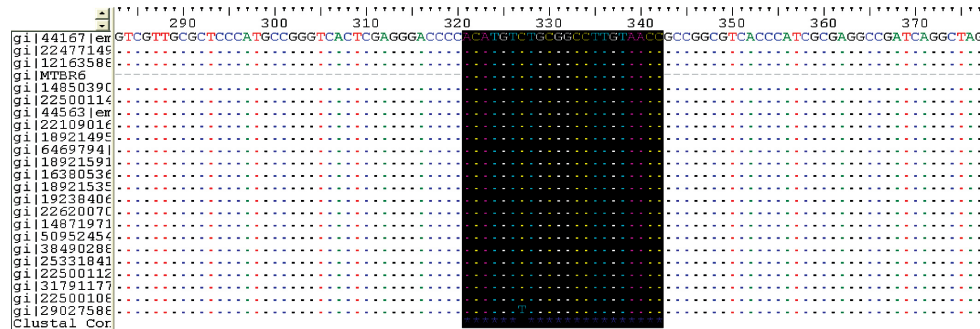
Cryptococcus neoformans, *Leptothrix cholodnii*, *Haliangium ochraceum*, *Streptomyces scabiei* nhưng không có sự bắt cặp đồng thời hai môi trên cùng một loài (dữ liệu không trình bày). Mẫu dò có xảy ra hiện tượng bắt cặp hoàn toàn ở cả đầu 5’ và 3’ với trình tự của *M. celatum* nhưng môi không bắt cặp với trình tự gen *α antigen* thuộc loài này (dữ liệu không trình bày) nên điều này cũng không gây ra ảnh hưởng đến thực nghiệm.

Ngoài ra, môi và mẫu dò còn được sắp giống cột bằng chương trình ClustalX và khảo sát khả năng bắt cặp của môi lên trình tự đích với chương trình Annhyb. Kết quả cho thấy, vị trí bắt cặp của hệ môi, mẫu dò có độ bảo tồn cao – gần 100% và cả hệ bắt cặp hoàn toàn với các trình tự mục tiêu (số điểm bắt cặp là gần 100%).

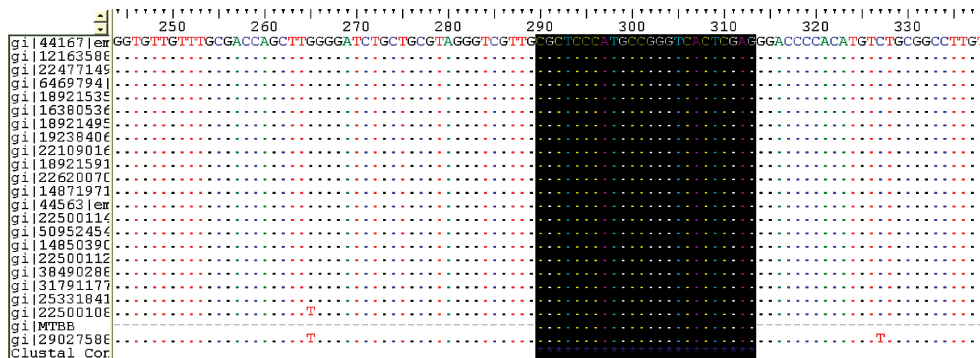
Hình 1. Kết quả sắp giống cột một số trình tự gen *α antigen* và môi xuôi bằng chương trình ClustalX.



Hình 2. Kết quả sắp giống cột một số trình tự gen *α antigen* và môi ngược bằng chương trình ClustalX.



Hình 3. Kết quả sắp giống cột một số trình tự gen *α antigen* và mẫu dò bằng chương trình ClustalX.



Hình 4. Kết quả mô phỏng sự bắt cặp của môi và mẫu dò trên một trình tự gen *α antigen* bằng Annhyb.

Name	init	end	comments
MTBP5 art	290	312	found oligo score: 100 sense: ...
MTBF0 design	287	288	found oligo score: 100 sense: ...
MTBR0 design	321	342	found oligo score: 100 sense: ...

1	TCAGCCGGCG	CCTAACGAAC	TCTGCAGGTC	ACCCCTTCATG	GCCTTGAGCT
51	GAGCGCCCCA	GTACTCCAG	CTGTGCGTGC	CCTTGGGCGG	GAACTTGAAC
101	ACGGCGTTGT	GCCCGCCGC	GGCGTTGTAC	GCATCCTGGA	ACTTCAGGTT
151	GCTGCTACGA	ACGAAGTCT	CCAAAGAATC	GGCGGGATG	TTGGACCCGC
201	CCAACTCGTT	CGGGGTGCCG	TTCCCGCAAT	AAACCCATAG	CCGGGTGTTG
251	TTTGCGACCA	GCCTTCGA	CTGCAGGTC	GGGTGCTG	CTCCGCACTC
301	CGGGTCACTC	GGGACCCC	ACATGTCTGG	GGCCTTGTA	CGCCGGCGT
351	CACCCATCGC	GAGGCCGAT	AGGCTAGGCC	CCATCCCCTG	AGAGGGGTCC
401	AGCAGGGCCG	ACAGCGAGCC	GGCTAGATG	AACCTGCTGG	GCTGTAGGC
451	GGCCAAAGATC	ATTGCCGACG	AGCCGGCCAT	CGACAAGCCG	ATTGCAGCGC
501	TGCCGGTGGG	CTTACGGGCC	CTGTTGGCGG	ACAACCATTT	CGGCAGCTCG
551	CTGGTCAGGA	AGGTTTCCCA	CTGTGAAGTC	TGGAGCCAG	CCTTACCGCA
601	GGCGGGCTG	TACCACTGC	TGTAGAAGCT	GAAGTCCCG	CGACCGGCA
651	TSACTATCGA	CAGTCCCGAC	TGTAGTACG	ACTCGAAGCC	CGGGGTGTTG
701	ATATCCCAAG	CCTTGTAGTC	GTCTTGGGCG	CGCAGGCCGT	CGAGCAGATA
751	AACCGCAGGT	GAGTTGTTCC	CACCGCTCTG	GAACTGAACC	TTGATGTCGC
801	GGCCCATCGA	CGCGACGGC	ACCTGCAAGT	ACTCGACCGG	CAGCCCCGGC
851	CGGGAGAACG	CGCCCGGGT	TGCCGCTCCG	CGCGAAGCC	CCACAGGCC
901	CGGAAGGACT	ACAGCCGCTG	CCGTGCCGAT	CATCAATCGG	CGTCCCCAAG
951	CTCGAATCTT	TCGGCTCAGG	TCTGTCAAT		

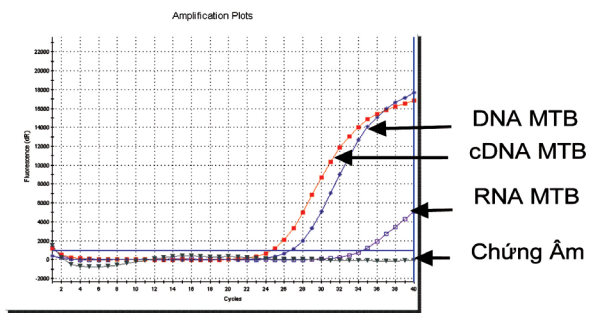
Các kết quả biểu diễn trên các hình 1, 2, 3 và 4 có thể khẳng định trên lý thuyết hệ môi và mẫu dò của gen *α antigen* có độ đặc hiệu tuyệt đối với trình tự đích.

Kết quả xây dựng quy trình Real-time RT-PCR

Độ đặc hiệu của các môi, mẫu dò

Nguồn vi khuẩn MTB trong lô thí nghiệm này đã được kiểm chứng bằng Real-time PCR và sử dụng cùng một loại mật độ (10^5 copy/ml) cho tất cả các trường hợp. Thử nghiệm độ đặc hiệu của môi và mẫu dò được chúng tôi tiến hành trên RNA ly trích từ vi khuẩn lao MTB đã qua xử lý với DNase. Sản phẩm cDNA được tiến hành realtime PCR cùng với DNA và cả cDNA được phiên mã ngược từ RNA tách chiết mà chưa qua xử lý với DNase (hình 5).

Hình 5. Kết quả khảo sát khả năng khuếch đại của hệ môi và mẫu dò trên MTB

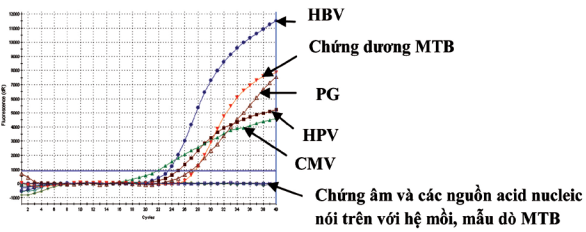


Biểu đồ ở hình 5 cho thấy các mẫu acid nucleic MTB có tín hiệu huỳnh quang vượt trên tín hiệu nền ở cả ba trường hợp Real-time PCR từ DNA của MTB, cDNA thu nhận sau phản ứng phiên mã ngược đi từ RNA được tách chiết từ MTB đã qua và chưa qua xử lý với DNase. Mẫu chứng âm (được thiết kế với các thành phần tương tự cho phản ứng Real-time PCR và Real-time RT-PCR, chỉ thay acid nucleic bằng nước) có tín hiệu huỳnh quang thấp hơn tín hiệu nền.

Chúng tôi cũng đã thử nghiệm độ đặc hiệu của cặp môi và mẫu dò này trên nguồn acid nucleic được ly trích từ các vi sinh vật khác như *Hepatitis B virus* (HBV), *Porphyromonas gingivalis* (PG), *Cytomegalovirus* (CMV), *Human papiloma*

virus (HPV) (hình 6), đều không cho tín hiệu huỳnh quang vượt trên tín hiệu nền.

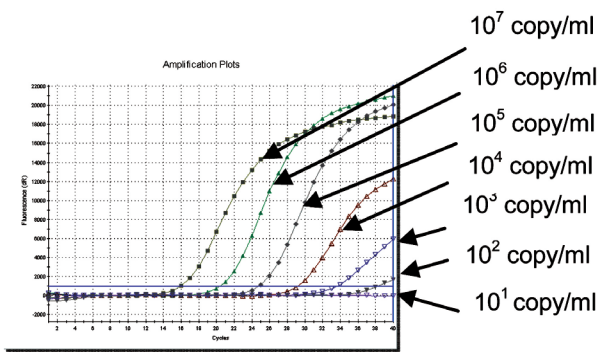
Hình 6. Kết quả khảo sát khả năng khuếch đại của hệ môi và mẫu dò trên MTB và các nguồn vi sinh vật khác



Kết quả cho thấy hệ môi và mẫu dò của chúng tôi chỉ hoạt động hiệu quả và đặc hiệu trên gen *α antigen* của MTB. Tuy nhiên, để có thể phát hiện một cách chính xác mức độ biểu hiện của mRNA *α antigen*, quy trình tách chiết RNA phải qua xử lý DNase trước khi thực hiện Real-time RT-PCR.

Độ nhạy của phản ứng

Hình 7. Kết quả khảo sát độ nhạy của hệ môi và mẫu dò trên MTB



Biểu đồ cho thấy tín hiệu huỳnh quang vượt trên tín hiệu nền từ mẫu có nồng độ 10^7 copy/ml với chu kỳ ngưỡng (Ct) giảm dần đến mẫu có nồng độ 10^2 copy/ml. Mẫu có nồng độ 10 copy/ml thì có tín hiệu huỳnh quang thấp hơn tín hiệu nền. Như vậy, độ nhạy của Real-time RT-PCR đạt 10^2 copy/ml.

Kết quả Realtime RT-PCR trên bệnh phẩm

Bước đầu, quy trình Real-time RT-PCR vừa xây dựng được sử dụng, kết hợp với nhuộm soi đàm và Real-time PCR dựa trên DNA đích *IS6110*, thử nghiệm trên 30 mẫu bệnh phẩm đàm thu nhận từ các bệnh nhân lao đang trong quá trình điều trị. Kết

quả cho thấy có 8 mẫu cho kết quả âm tính hoàn toàn đối với cả ba phương pháp, 9 mẫu dương tính được phát hiện theo quy trình Real-time RT-PCR, trên tổng số 22 mẫu dương tính được phát hiện bằng Real-time PCR; không có trường hợp nào có kết quả âm tính ghi nhận bằng các phương pháp khác mà dương tính với phương pháp vừa xây dựng. Sự khác biệt ở các kết quả dương tính giữa quy trình vừa mới xây dựng so với Real-time PCR là 13 trường hợp. Có thể giải thích sự khác biệt này là do (1) các mẫu bệnh phẩm này trong quá trình điều trị, tính hiệu quả của phác đồ đã làm cho vi khuẩn lao không còn sống trong bệnh phẩm hay (2) không loại trừ khả năng vi khuẩn chết trong lúc vận chuyển, mặc dù khả năng này là rất khó xảy ra. Bất luận, dù khả năng (1) hay (2) xảy ra, thì có thể kết luận bước đầu rằng phương pháp Real-time PCR không thể phân biệt được mẫu chứa vi khuẩn lao sống hay chết.

Trong các nghiên cứu của Desjardin và ctv (1996), Nainn-Tsy Jou và ctv (1997), Hellyer và ctv (1998), mặc dù các tác giả đã áp dụng phương pháp RT-PCR; hoặc Mdivani và ctv (2009) sử dụng phương pháp Real-time RT-PCR trên trình tự mRNA α antigen của vi khuẩn lao, nhưng các tác giả trên chỉ mới dừng lại ở việc so sánh kết quả của phản ứng trên mRNA so với DNA, mà chưa đưa ra một quy trình Real-time RT-PCR cụ thể. Hơn nữa, trong các công trình trên, hệ môi và mẫu dò được thiết kế chỉ nhằm khuếch đại đặc hiệu trên một chủng lao nhất định. Việc xây dựng thành công quy trình phát hiện vi khuẩn lao sống bằng phương pháp real-time RT-PCR trên trình tự mRNA 85B của bốn loài vi khuẩn lao gây bệnh trên người là sự tiếp nối các kết quả của những nghiên cứu trên, đồng thời phát triển và hoàn chỉnh các kết quả đó nhằm hướng tới ứng dụng thực tế. Nghiên cứu này nên được tiếp tục với cỡ mẫu lớn hơn, và việc thu mẫu nên được tiến hành nhiều lần trên cùng một mẫu trong suốt quá trình

điều trị nhằm đánh giá hiệu quả của phương pháp này trong theo dõi hiệu quả điều trị bệnh lao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần VS. Đặc điểm của bệnh lao. *Bệnh học lao*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 2007, trang 10 – 20
2. World Health Organization, Global tuberculosis control, 2009.
3. Ahmad S, Mokaddas E. 2009. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Respiratory Medicine*. doi:10.1016/j.rmed.2009.07.010
4. Mitchison DA. Assessment of new sterilizing drugs for treating pulmonary tuberculosis by culture at 2 months. *Am Rev Resp Dis* 1993;147:1062–3.
5. Jindani A, Aber VR, Edwards EA, Mitchison DA. The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Resp Dis* 1980;121:939–49.
6. Aellen S, Que YA, Guignard B, Haenni M, Moreillon P. Detection of live and antibiotic-killed bacteria by quantitative real-time PCR of specific fragments of rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1913–20.
7. Desjardin LE, Perkins MD, Wolski K, Haun S, Teixeira L, Chen Y, et al. Measurement of sputum *Mycobacterium tuberculosis* messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy. *Am J Resp Crit Care Med* 1999;160:203–10.
8. Jou NT, Yoshimori RB, Mason GR, Louie JS, Liebling MR. Single-tube, nested, reverse transcriptase PCR for detection of viable *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1997;35:1161–5.
9. Miki K, Nagata T, Tanaka T, et al. 2004. Induction of Protective Cellular Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by Recombinant

- Attenuated Self-Destructing *Listeria monocytogenes* Strains Harboring Eukaryotic Expression Plasmids for Antigen 85 Complex and MPB/MPB51. *Infect Immun.* 72(4): 2014–2021
10. Mdivani N, Li H, Akhalaia M, *et al.* 2009. Monitoring therapeutic efficacy by real-time detection of *Mycobacterium tuberculosis* mRNA in sputum. *Clinical Chemistry* 55:9
11. Hellyer TJ, Desjardin LE, Hehman GL, *et al.* Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, Feb. 1999, p. 290–295
12. Weker HG and Morten H. 1992. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*, Dec.1992, p. 648- 661.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tiến hành với sự tài trợ kinh phí một phần từ đề tài nghiên cứu khoa học cấp trường Đại học Mở. Chúng tôi xin ngỏ lời cảm ơn đến bệnh viện Lao Trung ương đã cung cấp chủng *Mycobacterium tuberculosis* và bệnh viện Đa khoa Hòa Thành, bệnh viện Lao và Bệnh Phổi tỉnh Tây Ninh đã cung cấp mẫu bệnh phẩm.