

# Đánh giá kháng nguyên tái tổ hợp hemolysin co-regulated protein 1 (hcp1) trong chẩn đoán nhanh bệnh nhân nhiễm melioidosis (bệnh Whitmore) bằng kỹ thuật ELISA

Trần Thị Lệ Quyên<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Tình<sup>1</sup>, Bùi Nguyễn Hải Linh<sup>1</sup>, Đỗ Quốc Tuấn<sup>2</sup>, Trần Anh Đào<sup>3</sup>, Phạm Thị Huyền<sup>4</sup>, Trịnh Hồ Tinh<sup>5</sup>, Quế Anh Trâm<sup>3</sup>, Hoàng Quang Trung<sup>4</sup>, Trịnh Thành Trung<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>2</sup>Bệnh viện Đa khoa tỉnh Bắc Giang

<sup>3</sup>Bệnh viện Đa khoa tỉnh Nghệ An

<sup>4</sup>Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Tĩnh

<sup>5</sup>Bệnh viện Đa khoa tỉnh Bình Định

Ngày nhận bài 8/4/2020; ngày gửi phản biện 21/4/2020; ngày nhận phản biện 16/6/2020; ngày chấp nhận đăng 6/7/2020

## Tóm tắt:

Melioidosis (hay còn gọi là bệnh Whitmore) là một loại bệnh truyền nhiễm nguy hiểm do vi khuẩn *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) gây nên. Bệnh có biểu hiện lâm sàng đa dạng. Vì vậy, chẩn đoán khẳng định ca nhiễm bệnh phải dựa trên bằng chứng xét nghiệm vi sinh lâm sàng. Tuy nhiên, độ nhạy của phương pháp xét nghiệm nuôi cấy thường phụ thuộc vào nhiều yếu tố, dẫn đến nguy cơ bỏ sót ca bệnh trong quá trình xét nghiệm. Trong nghiên cứu này, các tác giả xác định gene BPSS1498 mã hóa hemolysin co-regulated protein 1 (hcp1), tạo dòng và biểu hiện protein bằng tế bào *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Protein hcp1 có kích thước 18,7 kDa được tinh sạch. Western blot chứng minh hcp1 gắn kết đặc hiệu với kháng thể IgG của bệnh nhân nhiễm melioidosis. Phương pháp hcp1-ELISA được thiết lập và đánh giá trên 94 mẫu huyết thanh (32 mẫu từ nhóm bệnh nhân melioidosis, 32 mẫu từ nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết khác và 30 mẫu từ nhóm người khỏe mạnh). Sử dụng giá trị cut-off là 0,595, kỹ thuật hcp1-ELISA đạt độ nhạy 93,7% và độ đặc hiệu 98,4%. Kết quả nghiên cứu này mở ra hướng chẩn đoán mới trong xét nghiệm sàng lọc bệnh nhân nhiễm melioidosis tại Việt Nam, trên đối tượng bệnh nhân sốt kéo dài chưa rõ nguyên nhân do những hạn chế khi nuôi cấy vi khuẩn *B. pseudomallei* từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

**Từ khóa:** *Burkholderia pseudomallei*, ELISA, hcp1 protein, kháng nguyên protein tái tổ hợp, melioidosis, Whitmore.

**Chỉ số phân loại:** 3.5

## Đặt vấn đề

Melioidosis (hay còn gọi là bệnh Whitmore) là một loại bệnh truyền nhiễm nguy hiểm do vi khuẩn Gram âm *B. pseudomallei* sống ở trong đất gây nên. Melioidosis có bệnh cảnh lâm sàng đa dạng, có thể diễn tiến ở thể mạn tính, cấp tính và tối cấp tính kèm viêm phổi, nhiễm khuẩn huyết, sốc nhiễm khuẩn huyết và tử vong với tỷ lệ cao (>40%) nếu bệnh nhân không được chẩn đoán sớm và điều trị đúng kháng sinh theo phác đồ khuyến cáo [1]. Người có nguy cơ nhiễm bệnh cao là người có hoạt động thường ngày tiếp xúc với đất và nước nhiễm khuẩn, có độ tuổi trong khoảng từ 40 đến 70 tuổi (mặc dù bệnh vẫn gặp ở trẻ sơ sinh, trẻ em và người trưởng thành), người có các bệnh nền như tiểu đường, bệnh phổi và thận mạn tính, người nghiện rượu hoặc người thường xuyên sử dụng corticoid [1-3].

Con đường lây truyền chính của bệnh là tiếp xúc trực tiếp vết thương hở với đất và nước nhiễm vi khuẩn. Ngoài ra, bệnh có thể lây truyền qua con đường ăn uống khi ăn

thực phẩm tươi sống và uống nước chưa đun sôi nhiễm vi khuẩn. Bệnh cũng có thể lây truyền qua con đường hô hấp khi hít phải các hạt bụi hoặc hạt sol khí tạo ra trước cơn mưa lớn. Vì vậy, tỷ lệ nhiễm melioidosis thường tăng cao vào mùa mưa [1, 2].

Do dấu hiệu và triệu chứng lâm sàng đa dạng, có thể nhầm lẫn với các bệnh truyền nhiễm khác nên chẩn đoán melioidosis phải phụ thuộc chính vào xét nghiệm nuôi cấy và định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* trong các mẫu bệnh phẩm lâm sàng. Tuy nhiên, xét nghiệm vi sinh có một số hạn chế nhất định là: (i) thời gian nuôi cấy và trả kết quả của xét nghiệm kéo dài từ 3-5 ngày; (ii) nhiều cán bộ xét nghiệm vi sinh chưa có kỹ năng nhận diện khuẩn lạc *B. pseudomallei* mọc trên môi trường nuôi cấy; (iii) nhiều mẫu bệnh phẩm tạp nhiễm như đờm, ngoáy họng và nước tiểu cần phải sử dụng môi trường chọn lọc để nuôi cấy tăng sinh và làm giàu vi khuẩn *B. pseudomallei* trước khi phân lập; (iv) các phương pháp định danh sinh hóa API 20NE hoặc máy định

\*Tác giả liên hệ: Email: tttrung@vnu.edu.vn

# Evaluation of recombinant hemolysin co-regulated protein 1 (hcp1) for rapid diagnosis of melioidosis (Whitmore's disease) using ELISA assay

Thi Le Quyen Tran<sup>1</sup>, Thi Tinh Nguyen<sup>1</sup>,  
Nguyen Hai Linh Bui<sup>1</sup>, Quoc Tuan Do<sup>2</sup>, Anh Dao Tran<sup>3</sup>,  
Thi Huyen Pham<sup>4</sup>, Ho Tinh Trinh<sup>5</sup>, Anh Tram Que<sup>3</sup>,  
Quang Trung Hoang<sup>4</sup>, Thanh Trung Trinh<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi

<sup>2</sup>Bac Giang Provincial General Hospital

<sup>3</sup>Nghe An Provincial General Hospital

<sup>4</sup>Ha Tinh Provincial General Hospital

<sup>5</sup>Binh Dinh Provincial General Hospital

Received 8 April 2020; accepted 6 July 2020

## Abstract:

Melioidosis (also called Whitmore's disease) is a fatal infectious disease caused by a Gram-negative soil-dwelling bacterium *Burkholderia pseudomallei*. Due to the diverse clinical manifestations, final diagnosis of the disease mostly relies on the examination of bacterial culture. However, the sensitivity of the culture method depends on various factors, leading to the misdiagnosis of the disease in the clinical setting. In this study, the authors amplified BPSS1498 gene coding hemolysin co-regulated protein 1 (hcp1), cloned and expressed the recombinant protein using *E. coli* BL21(DE3) pLysS. The recombinant hcp1 protein antigen with 18.7 kDa was then purified and demonstrated a highly specific binding with human IgG of the culture-confirmed patient with melioidosis using Western blot. Hcp1-ELISA was established and evaluated on 94 sera collected from 32 culture-confirmed patients with melioidosis, 32 patients infected with other bacteria, and 30 healthy persons. Using a cut-off value of 0.595, hcp1-ELISA showed a sensitivity of 93.7% and a specificity of 98.4%. Those results lead to a potential application of hcp1-ELISA in the diagnosis of melioidosis in Vietnam, especially on the diagnosis of the disease in patients with fever of unknown origin due to the limitation of the routine culture methods.

**Keywords:** *Burkholderia pseudomallei*, ELISA, hcp1 protein, melioidosis, recombinant protein antigen, Whitmore.

**Classification number:** 3.5

đánh vi khuẩn tự động như Vitek 2 và Phoenix 100 trong các phòng xét nghiệm vi sinh thường định danh sai vi khuẩn *B. pseudomallei* thành những loài vi khuẩn khác [4]. Những hạn chế của phương pháp xét nghiệm nuôi cấy vi sinh có thể là nguyên nhân dẫn đến bỏ sót các ca nhiễm melioidosis. Bên cạnh đó, nghiên cứu trên bệnh nhân melioidosis [5] cho thấy, số lượng *B. pseudomallei* trong máu bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết là khá thấp, dao động trong khoảng từ 0,2-7,7 CFU/ml. Điều đó cũng ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp xét nghiệm nuôi cấy vi sinh.

Một số kỹ thuật khác cũng đã được sử dụng để phát hiện trực tiếp căn nguyên *B. pseudomallei* từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng như kỹ thuật real-time PCR nhưng độ nhạy của phương pháp đối với mẫu máu thử nghiệm vẫn còn thấp [6]. Năm 2009, Felgner và cs [7] đã ứng dụng kỹ thuật microarray sàng lọc được 49 protein kháng nguyên có khả năng ứng dụng trong chẩn đoán huyết thanh bệnh nhân nhiễm melioidosis. Gần đây, một số nghiên cứu [8, 9] cũng đã tiến hành thử nghiệm các protein kháng nguyên trong chẩn đoán bệnh như 60 kDa molecular chaperone GroEL, hydroperoxide reductase, và hemolysin co-regulated protein (hcp1). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tạo dòng, biểu hiện, tinh sạch và đánh giá khả năng ứng dụng protein kháng nguyên tái tổ hợp hcp1 bằng kỹ thuật ELISA để chẩn đoán bệnh nhân đã được xác định nhiễm melioidosis tại một số vùng của Việt Nam.

## Đối tượng và phương pháp

### Mẫu huyết thanh

Từ 2018-2019, chúng tôi đã thu thập 94 mẫu huyết thanh tại 4 bệnh viện đa khoa tỉnh gồm Bắc Giang, Nghệ An, Hà Tĩnh và Bình Định. Các mẫu huyết thanh thu được bao gồm 32 mẫu từ nhóm bệnh nhân melioidosis [2], 32 mẫu từ nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn khác và 30 mẫu từ nhóm người khỏe mạnh. Huyết thanh của bệnh nhân nhiễm melioidosis được lấy sau khi có kết quả nuôi cấy vi sinh khẳng định phân lập được vi khuẩn *B. pseudomallei* từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng (sau 3 đến 10 ngày nhập viện). Huyết thanh của bệnh nhân nhiễm khuẩn khác được thu thập sau khi có kết quả định danh vi khuẩn bằng máy Phoenix hoặc máy Vitek 2 và các vi khuẩn được định danh là *Staphylococcus aureus* (n=6), *Escherichia coli* (n=9), *Klebsiella pneumoniae* (n=6), *Enterococcus* spp. (n=2), *Acinetobacter* spp. (n=1), *Pseudomonas* spp. (n=4), *Streptococcus* spp. (n=3), và *Salmonella* spp. (n=1). Tỷ lệ giới tính nam/nữ của nhóm nhiễm melioidosis là 3,6; nhóm nhiễm khuẩn khác là 3,3; nhóm khỏe mạnh là 3,3. Độ tuổi trung bình của các nhóm lần lượt là 55±17, 54±17 và 47±20. Huyết thanh sau khi thu thập được bảo quản ở -20°C trước khi tiến hành thử nghiệm.

### Tạo dòng và biểu hiện protein kháng nguyên hcp1

DNA vi khuẩn được tách chiết từ chủng *B. pseudomallei*

NA23 sử dụng chloroform: isoamyl alcohol. Chủng *B. pseudomallei* NA23 được phân lập từ bệnh nhân melioidosis nam 49 tuổi nhiễm khuẩn huyết kèm viêm phổi tại Nghệ An năm 2015. Trình tự kiểu gene của chủng vi khuẩn này được xác định là sequence type (ST) 46 và đã được đăng ký trên cơ sở dữ liệu multilocus sequence typing (MLST; <https://pubmlst.org/bpseudomallei/>). ST 46 là kiểu trình tự gene thường gặp trong lâm sàng và ngoài môi trường Việt Nam [3, 10]. Nồng độ và mức độ tinh sạch của DNA được kiểm tra trên máy NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

PCR khuếch đại gene BPSS1498 mã hóa protein hcp1 được thực hiện trong phản ứng có tổng thể tích 25 µl sử dụng Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) và cặp mồi đặc hiệu đã được mô tả trong nghiên cứu của Burtnick và cs (2011) [11] và được thiết kế phù hợp với trình tự nhận biết của enzyme giới hạn Esp3I. Chu trình nhiệt được thực hiện trên máy Biometra Trio (Analytik Jena, Đức) với điều kiện phản ứng PCR là 95°C trong 30 giây; 35 chu kỳ 95°C trong 10 giây; 61°C trong 30 giây; 72°C trong 45 giây; 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR có kích thước 534 bp được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8%, sau đó được tinh sạch bằng kit GeneJET PCR purification (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) trước khi đưa vào vector pPSG-IBA3 (IBA, Đức) và nhân dòng bằng chủng *Escherichia coli* DH5α.

Plasmid pPSG-IBA3:BPSS1498 từ các dòng *E. coli* DH5α màu trắng trên môi trường thạch LB chứa X-gal 20 mg/ml tiếp tục được tách chiết bằng chloroform: isoamyl alcohol trước khi biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Để biểu hiện protein kháng nguyên tái tổ hợp hcp1, các dòng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) pLysS mang plasmid pPSG-IBA3:BPSS1498 được nuôi cấy trên 20 ml môi trường LB lỏng chứa ampicillin 100 µg/ml và 10 µl chất cảm ứng IPTG 1 M (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Sau 4 giờ nuôi cấy ở 37°C và tốc độ lắc 160 vòng/phút, tế bào vi khuẩn được thu bằng cách ly tâm 8000 vòng/phút trong 5 phút và được lưu giữ ở -20°C cho các bước thí nghiệm tiếp theo.

#### Tinh sạch protein kháng nguyên hcp1

Tế bào vi khuẩn biểu hiện protein tái tổ hợp được hòa vào đệm W chứa 6 M urea. Sau 3 giờ ủ ở nhiệt độ phòng, hỗn hợp tế bào được ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 30 phút. Phần huyền phù được tải lên cột Strep-tactin XT (IBA, Đức). Quy trình rửa và thu hồi protein kháng nguyên tái tổ hợp hcp1 được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

#### Kỹ thuật SDS-PAGE

Các phân đoạn tải mẫu, rửa cột và thu hồi protein tái

tổ hợp trên cột Strep-tactin XT, cùng thang chuẩn protein (PageRuler™ Unstained Protein Ladder 10 to 200 kDa, Thermo Fisher Scientific, Mỹ) được điện di trên gel SDS-PAGE nồng độ polyacrylamide 15% (Sigma, Mỹ) ở hiệu điện thế 120 V và thời gian điện di 2 giờ. Bản gel sau khi điện di được nhuộm với Comassie Brilliant Blue 0,1% (Bio Basic, Canada) trong 30 phút, sau đó tẩy gel bằng dung dịch tẩy màu (methanol 40% và acetic acid 10%; Thermo Fisher Scientific, Mỹ) trong 45 phút và thay dịch tẩy màu sau mỗi 15 phút.

#### Kỹ thuật western blot

Protein trên gel SDS-PAGE sau điện di được thấm lên màng polyvinylidene difluoride (PVDF, Thermo Fisher Scientific, Mỹ) bằng máy chuyển màng (SD10, Cleaver Scientific, Anh) ở hiệu điện thế 30 V trong 1 giờ. Màng PVDF sau đó được ngâm với đệm PBS chứa 5% BSA và 0,05% Tween 20, rửa 3 lần với đệm PBS và ủ với kháng thể dê kháng kháng thể người IgG cộng hợp horseradish peroxidase (pha loãng trong đệm PBS 1:10000; Abcam, Mỹ). Sau khi rửa với đệm PBS, màng được ủ với dung dịch cơ chất TMB (Pierce™ 1-Step Ultra TMB, Thermo Fisher Scientific, Mỹ) đến khi xuất hiện màu phản ứng.

#### Kỹ thuật ELISA

Protein kháng nguyên tái tổ hợp hcp1 ở các phân đoạn sạch được trộn đều và định lượng bằng phương pháp Bradford sử dụng chất chuẩn BSA (Bio Basic, Canada) với dãy pha loãng 10-80 µg/ml trong đệm PBS. Lượng protein kháng nguyên tái tổ hợp hcp1 (1 µg/giếng) được gắn lên đĩa ELISA và ủ ở 4°C qua đêm. Protein dư thừa được loại bỏ và rửa 3 lần với đệm PBS chứa 0,05% Tween 20 (Bio Basic, Canada). Sau khi ủ với đệm PBS chứa 1% BSA, huyết thanh thử nghiệm pha loãng với đệm PBS ở tỷ lệ 1:4000 được tra vào các giếng ELISA. Sau khi rửa đĩa 3 lần, mỗi giếng được bổ sung 100 µl kháng thể dê kháng kháng thể người IgG cộng hợp horseradish peroxidase (pha loãng trong đệm PBS 1:10000; Abcam, Mỹ) và ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sau khi đổ bỏ dịch dư thừa và rửa đĩa 3 lần, các giếng tiếp tục được ủ 30 phút trong tối ở nhiệt độ phòng với 100 µl dung dịch cơ chất OPD (100 ml dung dịch O-phenylenediamine dihydrochloride 0,016% (Sigma, Mỹ) chứa 16 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Merck, Đức)). Phản ứng enzyme-cơ chất được dừng bằng 50 µl dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M (Merck, Đức). Cường độ màu tạo thành được đo ở bước sóng 490 nm trên máy 800 TS Microplate Reader (BioTek, Mỹ).

#### Kết quả

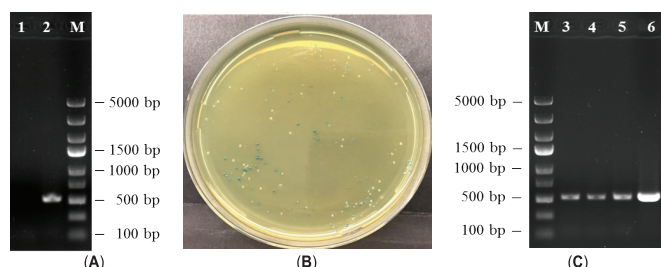
##### PCR gene BPSS1498 mã hóa protein hcp1

DNA khuôn của chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* NA23 được sử dụng để khuếch đại gene BPSS1498 với cặp mồi

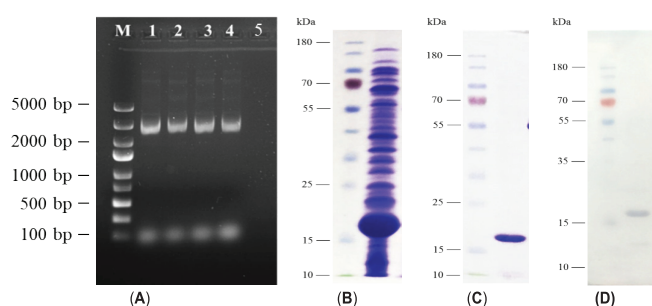
được thiết kế để đảm bảo phản ứng PCR nhân đặc hiệu gene đích và có trình tự để enzyme giới hạn Esp3I nhận diện. Sản phẩm PCR có kích thước 534 bp (bao gồm 507 bp gene *hcp1* và phần dư 27 bp tại 2 đầu 5' của primers để enzyme giới hạn nhận diện) được trình bày tại hình 1A.

### Tạo dòng và lựa chọn chủng biểu hiện protein kháng nguyên *hcp1*

Sản phẩm PCR gene BPSS1498 được tinh sạch và xử lý với enzyme giới hạn Esp3I. Sau khi gắn vào vector pPSG-IBA3, plasmid được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 $\alpha$ . Các khuẩn lạc *E. coli* DH5 $\alpha$  mang plasmid pPSG-IBA3 chứa gene BPSS1498 có màu trắng trên môi trường LB có X-gal được lựa chọn (hình 1B). *E. coli* DH5 $\alpha$ /pPSG-IBA3::BPSS1498 tiếp tục được nuôi cấy trên môi trường LB dịch thể có bổ sung ampicillin nhằm phục vụ cho việc tách chiết plasmid pPSG-IBA3:BPSS1498 (hình 2A) và biến nạp vào dòng tế bào biểu hiện *E. coli* BL21(DE3) pLysS.



**Hình 1. Kết quả PCR và tạo dòng.** (A) Giếng 1 là đối chứng âm, giếng 2 là sản phẩm PCR gene BPSS1498 khuếch đại từ DNA khuôn của chủng *B. pseudomallei* NA23. (B) Tạo dòng vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  màu trắng mang plasmid pPSG-IBA3 chứa gene BPSS1498. (C) Kết quả PCR gene BPSS1498 khuếch đại trực tiếp từ các khuẩn lạc *E. coli* DH5 $\alpha$  màu trắng.

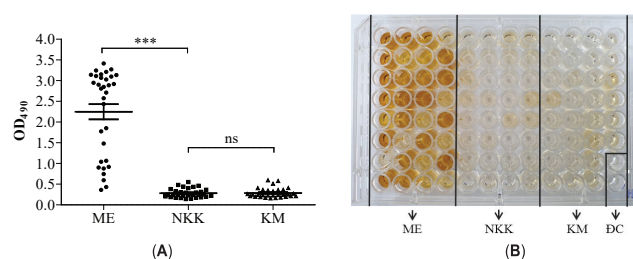


**Hình 2. Kết quả tách plasmid pPSG-IBA3::BPSS1498 (A), biểu hiện protein *hcp1* sử dụng *E. coli* BL21(DE3) pLysS (B), tinh sạch protein *hcp1* (C) và chạy western blot protein *hcp1* với huyết thanh bệnh nhân nhiễm melioidosis (D).**

### Chẩn đoán melioidosis bằng kỹ thuật *hcp1*-ELISA

ELISA được triển khai trên các mẫu huyết thanh thử nghiệm. Giá trị trung bình OD<sub>490</sub> của nhóm bệnh nhân melioidosis là 2,249±1,038 (dao động từ 0,363-3,414), của nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết khác là 0,283±0,106

(dao động từ 0,142-0,550), của nhóm người khỏe mạnh là 0,286±0,117 (dao động từ 0,157-0,595). Cường độ OD<sub>490</sub> của nhóm bệnh nhân melioidosis cao hơn cường độ OD<sub>490</sub> của nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết khác và nhóm người khỏe mạnh lần lượt là 7,94 và 7,86. Phân tích thống kê cho thấy, giá trị OD<sub>490</sub> của nhóm bệnh nhân melioidosis cao hơn có ý nghĩa thống kê so với giá trị OD<sub>490</sub> của nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết khác và nhóm người khỏe mạnh ( $p < 0,001$ ); giá trị OD<sub>490</sub> của nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết khác và nhóm người khỏe mạnh là tương đương nhau ( $p > 0,05$ ) (hình 3A). Nếu lấy OD<sub>490</sub> cao nhất trong nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết khác và nhóm người khỏe mạnh làm giá trị cut-off (OD<sub>490</sub> = 0,595) thì chỉ có 2 trên tổng số 32 bệnh nhân melioidosis bị chẩn đoán nhầm (âm tính giả), 1 trên tổng số 62 người nhiễm khuẩn huyết khác và người khỏe mạnh bị chẩn đoán nhầm (dương tính giả). Vì vậy, phương pháp *hcp1*-ELISA có độ nhạy là 93,7% và độ đặc hiệu là 98,4%.



**Hình 3. Đồ thị kết quả *hcp1*-ELISA (A) và hình ảnh đĩa *hcp1*-ELISA (B).** Nhóm bệnh nhân melioidosis (ME), nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết khác (NKK) và nhóm người khỏe mạnh (KM).

### Bàn luận

Melioidosis là bệnh truyền nhiễm phổ biến ở khu vực Đông Nam Á và vùng phía Bắc Australia. Tại Việt Nam, ca bệnh đầu tiên được phát hiện và mô tả năm 1925, sau đó, hàng trăm ca bệnh đã được phát hiện và công bố trên binh lính Pháp và Mỹ tham chiến tại Việt Nam. Năm 1969, melioidosis được liệt kê là 1 trong 6 bệnh truyền nhiễm gây tử vong cao mà binh lính Mỹ thường mắc phải trong chiến tranh Việt Nam [12]. Tuy nhiên, sau ngày miền Nam giải phóng, bệnh đã hoàn toàn bị lãng quên. Trong thời gian qua, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã tiên phong hướng dẫn nhiều bệnh viện tuyến tỉnh phương pháp nuôi cấy xét nghiệm vi khuẩn *B. pseudomallei* trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng. Chỉ trong thời gian ngắn, hàng trăm ca melioidosis đã được phát hiện [2, 12] Theo dự báo, mỗi năm ở Việt Nam có khoảng 10430 ca nhiễm melioidosis và con số tử vong khoảng 4703 ca [13]. Tuy nhiên, số lượng ca bệnh phát hiện ở nước ta đang thấp hơn rất nhiều so với các nước láng giềng và so với con số dự đoán của các chuyên gia quốc tế. Số lượng thấp đó có thể do sự hạn chế về độ nhạy của

phương pháp xét nghiệm nuôi cấy vi sinh dẫn đến bỏ sót ca bệnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển kỹ thuật chẩn đoán ELISA sử dụng protein hcp1 nhằm bổ sung thêm các phương pháp xét nghiệm melioidosis tại Việt Nam.

Genome của *B. pseudomallei* mã hóa hệ thống tiết loại 6 (type VI secretion systems; T6SSs), trong đó hcp proteins là những thành phần của hệ thống tiết loại 6 nằm trên bề mặt tế bào và thường tìm thấy trong dịch nuôi cấy vi khuẩn có hệ thống tiết này. Trong số 6 loại hcp thử nghiệm, chỉ duy nhất hcp1 có phản ứng với kháng thể của bệnh nhân nhiễm melioidosis khi thử bằng phương pháp western blot. Kết quả đó minh chứng hcp1 có khả năng biểu hiện *in vivo* và có khả năng kích thích tạo đáp ứng miễn dịch. Tuy nhiên, hcp1 không biểu hiện *in vitro* khi nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường dịch thể LB [11]. Điều đặc biệt là bệnh nhân nhiễm melioidosis không có kháng thể kháng các hcp proteins từ 2 tới 6. Hcp1 có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch để bảo vệ 50% chuột khi tiêm ở liều thử thách gấp 50 lần so với liều gây chết. Tuy nhiên, hcp proteins không được khuyến cáo cho chế tạo vaccine vì tính bảo vệ chuột tránh bệnh và tỷ lệ chuột chết là rất thấp khi lặp lại thử nghiệm. Vì vậy, nghiên cứu đã đề xuất hcp1 có thể ứng dụng trong chẩn đoán huyết thanh học [11]. Phân tích transcriptome cũng chỉ ra rằng, hcp1 biểu hiện mạnh trong quá trình xâm nhiễm đại thực bào U937 so với các gene khác trong hệ thống tiết loại 6 và cũng là protein duy nhất trong số 3 protein tái tổ hợp từ các gene BPSS0529, BPSS1498 và BPSS1499 lựa chọn có phản ứng dương tính với kháng thể của bệnh nhân melioidosis bằng kỹ thuật ELISA và western blot [14]. Nghiên cứu đánh giá phương pháp ELISA sử dụng các kháng nguyên O-polysaccharide (OPS), 6-deoxyheptancapsularpolysaccharide (CPS), whole-cell (WC) và culture filtrate (CF) trên huyết thanh của bệnh nhân Thái Lan nhiễm melioidosis thấy rằng, OPS-ELISA cho kết quả xét nghiệm tốt nhất [15]. Khi so sánh OPS-ELISA với hcp1-ELISA, Pumpuang và cs [9] đã kiểm chứng trên 141 mẫu huyết thanh thu thập ngay lúc bệnh nhân nhiễm melioidosis nhập viện, 188 người Thái Lan khỏe mạnh, 90 người Mỹ khỏe mạnh, 20 bệnh nhân lao phổi, 50 bệnh nhân sốt mò và 50 bệnh nhân nhiễm leptospirosis. Sử dụng giá trị cut-off tương ứng với độ đặc hiệu 95% thì độ nhạy của phương pháp ELISA hcp1 là 83%. Độ nhạy và độ đặc hiệu này tốt hơn so với phương pháp OPS-ELISA. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi sử dụng huyết thanh của người Việt Nam hoàn toàn tương đồng với các nghiên cứu trước đó. Kết quả minh chứng phương pháp hcp1-ELISA có độ nhạy và độ đặc hiệu rất cao, lần lượt là 93,7 và 98,4%.

Nghiên cứu theo dõi độ nhạy của phương pháp hcp1-ELISA tại các tuần 0, tuần 12 và tuần 52 cho thấy, độ nhạy

lần lượt là 81,5 (163/200), 82,3 (93/113) và 81,8% (90/110). So sánh hiệu giá kháng thể kháng hcp1 tại tuần 0 và tuần 12 không khác nhau nhiều nhưng có sự giảm đáng kể hiệu giá kháng thể ở tuần thứ 52 [9]. Điều đó cho thấy, hcp1-ELISA có khả năng chẩn đoán phân biệt người đã từng phơi nhiễm và người mới phơi nhiễm với vi khuẩn *B. pseudomallei*. Kết quả đó minh chứng tiềm năng sử dụng hcp1-ELISA như một phương pháp mới trong chẩn đoán huyết thanh bệnh nhân nhiễm melioidosis tại Việt Nam, đặc biệt ứng dụng trong chẩn đoán sàng lọc bệnh nhân nhiễm melioidosis trên các đối tượng bệnh nhân sốt kéo dài chưa rõ nguyên nhân, do sự hạn chế về độ nhạy của phương pháp xét nghiệm nuôi cấy vi sinh.

### Kết luận

Gene BPSS1498 mã hóa protein hcp1 được phân lập, tạo dòng và biểu hiện bằng tế bào *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Phương pháp hcp1-ELISA được triển khai đánh giá trên 94 mẫu huyết thanh (32 mẫu từ nhóm bệnh nhân melioidosis, 32 mẫu từ nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn khác và 30 mẫu từ nhóm người khỏe mạnh). Sử dụng giá trị cut-off là 0,595, phương pháp hcp1-ELISA đạt độ nhạy là 93,7% và độ đặc hiệu là 98,4%. Kết quả đạt được tương đồng với nhiều nghiên cứu trước đó trên thế giới. Phương pháp hcp1-ELISA được đề xuất ứng dụng trong chẩn đoán sàng lọc bệnh nhân nhiễm melioidosis tại Việt Nam, đặc biệt trên đối tượng bệnh nhân sốt kéo dài chưa rõ nguyên nhân do sự hạn chế của phương pháp xét nghiệm nuôi cấy vi sinh.

### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ nhiệm vụ Quỹ gene “Nghiên cứu khai thác nguồn gene vi khuẩn *Burkholderia pseudomallei* và đánh giá đặc tính sinh học nhằm nâng cao hiệu quả chẩn đoán, dự phòng và điều trị” (mã số NVQG-2018/08) do Bộ Khoa học và Công nghệ tài trợ. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] W.J. Wiersinga, B.J. Currie, S.J. Peacock (2012), “Melioidosis”, *N. Engl. J. Med.*, **367**(11), pp.1035-1044.
- [2] T.T. Trinh, et al. (2018), “A simple laboratory algorithm for diagnosis of melioidosis in resource-constrained areas: a study from north-central Vietnam”, *Clin. Microbiol. Infect.*, **24**(1), pp.84 e1-84 e4.
- [3] D.M. Phuong, et al. (2008), “Clinical and microbiological features of melioidosis in northern Vietnam”, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **102**, Suppl. 1, pp.S30-S36.
- [4] A.R. Hoffmaster, et al. (2015), “Melioidosis diagnostic workshop, 2013”. *Emerg. Infect. Dis.*, **21**(2), DOI: 10.3201/eid2102.141045.

- [5] V. Wuthiekanun, et al. (2007), "Quantitation of *B. pseudomallei* in clinical samples", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **77**(5), pp.812-813.
- [6] E.M. Meumann, et al. (2009), "Clinical evaluation of a type III secretion system real-time PCR assay for diagnosing melioidosis", *J. Clin. Microbiol.*, **44**(8), pp.3028-3030.
- [7] P.L. Felgner, et al. (2009), "A *Burkholderia pseudomallei* protein microarray reveals serodiagnostic and cross-reactive antigens", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**(32), pp.13499-13504.
- [8] C. Kohler, et al. (2016), "Rapid and sensitive multiplex detection of *Burkholderia pseudomallei* - specific antibodies in melioidosis patients based on a protein microarray approach", *PLOS Negl. Trop. Dis.*, **10**(7), DOI: 10.1371/journal.pntd.0004847.
- [9] A. Pumpuang, et al. (2017), "Comparison of O-polysaccharide and hemolysin co-regulated protein as target antigens for serodiagnosis of melioidosis", *PLOS Negl. Trop. Dis.*, **11**(3), DOI: 10.1371/journal.pntd.0005499.
- [10] T.T. Trinh, et al. (2019), "Erythritol as a single carbon source improves cultural isolation of *Burkholderia pseudomallei* from rice paddy soils", *PLOS Negl. Trop. Dis.*, **13**(10), DOI: 10.1371/journal.pntd.0007821.
- [11] M.N. Burtneck, et al. (2011), "The cluster 1 type VI secretion system is a major virulence determinant in *Burkholderia pseudomallei*", *Infect. Immun.*, **79**(4), pp.1512-1525.
- [12] T.T. Trinh, et al. (2018), "Melioidosis in Vietnam: recently improved recognition but still an uncertain disease burden after almost a century of reporting", *Trop. Med. Infect. Dis.*, **3**(2), DOI: 10.3390/tropicalmed3020039.
- [13] D. Limmathurotsakul, et al. (2016), "Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis", *Nat. Microbiol.*, **1**(1), DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.8.
- [14] S. Chieng, R. Mohamed, S. Nathan (2015), "Transcriptome analysis of *Burkholderia pseudomallei* T6SS identifies Hcp1 as a potential serodiagnostic marker", *Microb. Pathog.*, **79**, pp.47-56.
- [15] V. Suttisunhakul, et al. (2016), "Development of rapid enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Burkholderia pseudomallei*", *J. Clin. Microbiol.*, **54**(5), pp.1259-1268.