

Xây dựng quy trình khuếch đại đẳng nhiệt Recombinase polymerase amplification (RPA) phát hiện *Leptospira* spp. gây bệnh

Hồ Hữu Thọ^{1,2*}, Lê Thị Thúy¹, Nguyễn Đình Ứng¹, Hồ Anh Sơn¹, Hoàng Văn Lương¹, Nguyễn Văn Chuyên³, Nguyễn Văn Ba², Nguyễn Trọng Chính²

¹Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y

²Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

³Khoa Vệ sinh quân đội, Học viện Quân y

Ngày nhận bài 19/7/2019; ngày chuyển phân biện 22/7/2019; ngày nhận phân biện 19/8/2019; ngày chấp nhận đăng 28/8/2019

Tóm tắt:

Leptospirosis, hay vàng da do xoắn khuẩn là một trong những bệnh truyền nhiễm phổ biến nhất trên thế giới với tác nhân gây bệnh là các loài *Leptospira* spp. gây bệnh thuộc chi *Letospira*. Ở Việt Nam, leptospirosis được xem là bệnh đặc hữu và có nguy cơ bùng phát thành dịch cao nếu không được chẩn đoán và điều trị kịp thời. Ứng dụng kỹ thuật PCR là một hướng đi triển vọng trong phát hiện *Leptospira* spp. giai đoạn sớm của bệnh. Tuy nhiên, kỹ thuật này quá phức tạp và đòi hỏi khắt khe trong quá trình vận hành máy luân nhiệt, nên đã được thay thế bởi các phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã xây dựng thành công quy trình khuếch đại đẳng nhiệt Recombinase polymerase amplification (RPA) phát hiện chính xác một số loài *Leptospira* spp. gây bệnh chỉ với thời gian 30 phút. Quy trình RPA được xây dựng có ngưỡng phát hiện, độ nhạy và độ đặc hiệu tương đương với bộ kit thương mại hiện có trên thị trường.

Từ khóa: độ đặc hiệu, độ nhạy, khuếch đại đẳng nhiệt, *Leptospira* spp., Việt Nam.

Chỉ số phân loại: 3.5

Mở đầu

Leptospirosis, hay bệnh vàng da do xoắn khuẩn là bệnh truyền nhiễm phổ biến trên thế giới với tác nhân gây bệnh là các loài *Leptospira* spp. gây bệnh thuộc chi *Letospira* [1, 2]. Ở Việt Nam, leptospirosis được xem là bệnh đặc hữu và có nguy cơ bùng phát thành dịch nếu không được chẩn đoán và điều trị kịp thời [3]. Vì biểu hiện lâm sàng của bệnh giống với nhiều bệnh nhiễm trùng khác như rickettsia, dengue và các loại sốt xuất huyết do virus khác [4], nên trong vùng dịch tễ của bệnh leptospirosis thường không được đánh giá đúng mức. Do khó khăn trong chẩn đoán bệnh leptospirosis nên việc giám sát bệnh một cách thỏa đáng vẫn chưa được thực hiện. Các công cụ để chẩn đoán sớm góp phần đưa ra cảnh báo dịch sớm là hết sức cấp thiết.

Các phương pháp phát hiện *Leptospira* spp. hiện nay gồm nuôi cấy, huyết thanh học và các phương pháp sinh học phân tử [5]. Cây máu ở giai đoạn sớm của bệnh có thể được áp dụng cung cấp bằng chứng về việc bị nhiễm *Leptospira* spp. [2], tuy nhiên kết quả này lại không có giá trị phục vụ điều trị cho từng bệnh nhân vì thời gian để nuôi

cây thường mất hàng tuần đến hàng tháng [6]. Các phương pháp huyết thanh học thường được sử dụng trong chẩn đoán leptospirosis còn nhiều hạn chế, như quy trình thực hiện phức tạp và tốn nhiều công sức; thời gian xác định ca bệnh muộn do các kháng thể chỉ có thể được phát hiện trong giai đoạn muộn của bệnh, dẫn đến điều trị kháng sinh kém hiệu quả [7]. Ngược lại, hầu hết các phương pháp phát hiện sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử có thể được áp dụng trong giai đoạn sớm của bệnh [8]. Hiện nay, các quy trình realtime PCR đã xây dựng có thể phát hiện *Leptospira* spp. trong giai đoạn cấp tính sớm của bệnh với độ nhạy, độ đặc hiệu rất cao [1, 9]. Tuy nhiên, kỹ thuật này quá phức tạp và đòi hỏi khắt khe trong quá trình vận hành máy luân nhiệt, nên đã được thay thế bởi các phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt.

Khuếch đại DNA đẳng nhiệt là một phương pháp thay thế cho kỹ thuật PCR và được phát triển để phục vụ chẩn đoán tại chỗ [10, 11]. Vì là đẳng nhiệt, các phản ứng khuếch đại được thực hiện ở nhiệt độ không đổi và do đó không cần đến máy luân nhiệt đắt tiền. Các kỹ thuật khuếch đại DNA đẳng nhiệt rất đơn giản, nhanh chóng và hiệu quả về

*Tác giả liên hệ: Email: daibi0109@gmail.com

Development of isothermal Recombinase polymerase amplification (RPA) process for detection of *Leptospira* spp. causing diseases

Huu Tho Ho^{1,2*}, Thi Thuy Le¹, Dinh Ung Nguyen¹, Anh Son Ho¹, Van Luong Hoang¹, Van Chuyen Nguyen³, Van Ba Nguyen², Trong Chinh Nguyen²

¹Military Medical Research Institute, Military Academy

²Military Medical Hospital 103, Military Academy

³Department of Military Hygiene, Military Academy

Received 19 July 2019; accepted 28 August 2019

Abstract:

Leptospirosis is one of the common infectious diseases in the world with the pathogen as *Leptospira* spp. belonging to *Leptospira*. In Vietnam, leptospirosis is considered an endemic disease, and there is a high risk of outbreaks if not diagnosed and treated promptly. Application of realtime PCR technique is promoting technique in the detection of *Leptospira* spp. at the early stages of the disease. However, this technique is too complex and demanding in the operation of the thermal cyler, so it is increasingly replaced by isothermal amplification methods. In this study, the team successfully developed an isothermal amplification process using Recombinase polymerase amplification (RPA) to accurately detect *Leptospira* spp. causing the disease with the detection time of only 30 minutes. The RPA process developed by the team not only has a limit of detection (LOD) equivalent to the commercially available kit (100 copies/reaction) but also achieves similar sensitivity and specificity (100%).

Keywords: isothermal amplification, *Leptospira* spp., sensitivity, specificity, Vietnam.

Classification number: 3.5

chi phí, với độ đặc hiệu và độ nhạy tương đương với PCR [11]. Trong các kỹ thuật khuếch đại acid nucleic đẳng nhiệt, Recombinase polymerase amplification (RPA) cho thấy nhiều ưu điểm nổi bật. Sự khuếch đại trong phản ứng RPA được thực hiện nhờ vào sự kết hợp đặc hiệu của các enzyme và protein (recombinase, SSB protein và DNA polymerase thay thế sợi), giúp các primer gắn đặc hiệu vào gen đích và tổng hợp sợi mới. Phản ứng RPA có thể được tiến hành trong khoảng nhiệt độ từ 24-45°C, so với các kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt khác thì điều kiện nhiệt độ của RPA khá dễ dàng thiết lập và đảm bảo [12]. Thêm vào đó, các hóa chất của kỹ thuật này cho phép phát hiện tín hiệu realtime hoặc sau khi kết thúc phản ứng, nhờ vậy có thể được ứng dụng phù hợp trong nhiều hoàn cảnh khác nhau, ở phòng thí nghiệm chẩn đoán hiện đại hay xét nghiệm ngay tại thực địa.

Chính vì những lý do thực tiễn trên, nhóm nghiên cứu tiến hành xây dựng quy trình khuếch đại đẳng nhiệt RPA phát hiện *Leptospira* spp. gây bệnh. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của quy trình RPA đã xây dựng trên các mẫu dương tính giả định với 2 serovar *Leptospira* spp. gây bệnh phổ biến; các mẫu âm tính với *Leptospira* spp., chủng *Leptospira biflexa* serovar *Patoc* không gây bệnh và các chủng vi sinh vật thường gặp trong chẩn đoán phân biệt; đồng thời so sánh các thông số này với bộ kit thương mại hiện có trên thị trường (Primerdesign).

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Chủng chuẩn *Leptospira* spp. do Viện Y học Dự phòng Quân đội cung cấp: 2 serovar *Leptospira* spp. gây bệnh gồm *Leptospira interrogans* serovar *Pomona*, *Leptospira interrogans* serovar *Australis* và 1 chủng *Leptospira biflexa* serovar *Patoc* không gây bệnh.

Các mẫu bệnh phẩm dương tính giả định gồm 10 mẫu dương tính giả định *Leptospira interrogans* serovar *Pomona* và 10 mẫu dương tính giả định *Leptospira interrogans* serovar *Australis* các nồng độ cao, trung bình và thấp khác nhau do nhóm nghiên cứu chuẩn bị: 8×10^8 , 5×10^8 , 5×10^7 , 8×10^5 , 5×10^5 , 8×10^4 , 5×10^4 , 5×10^3 , 8×10^2 , 5×10^2 copy/p.u (tp1-tp10).

Các mẫu âm tính với *Leptospira* spp. gây bệnh (10 mẫu) được thu thập tại Phòng Công nghệ gen và di truyền tế bào, Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y.

Các chủng vi sinh vật thường gặp trong chẩn đoán phân biệt gồm Dengue virus, Hepatitis b virus (HBV), *Orientia tsutsugamushi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* do Khoa Vi sinh, Học viện Quân y cung cấp.

Bộ kit *Leptospirosis* outer membrane protein *lipL32* gene (Primerdesign) có độ đặc hiệu 100% với một loạt các trình tự gen các chủng *Leptospira* spp. gây bệnh. Trong điều kiện PCR tối ưu, bộ kit chẩn đoán *leptospirosis* có hiệu suất bắt cặp rất cao (>95%) và có thể phát hiện ít hơn 100 bản sao gen đích.

Các hóa chất, sinh phẩm và thiết bị dùng trong tách chiết DNA và phản ứng RPA.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA: DNA được tách chiết bằng bộ kit QiAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) theo quy trình của nhà sản xuất (Spin Protocol).

Thiết kế primer, probe cho phản ứng RPA: trình tự gen *lipL32* là gen mã hóa cho lipoprotein màng ngoài *lipL32*, dường như là một yếu tố độc lực quan trọng giúp xác định các chủng gây bệnh của tất cả các loài *Leptospira* spp. được lựa chọn là gen đích đặc hiệu thiết kế primer, probe cho phản ứng RPA phát hiện *Leptospira* spp. gây bệnh. Các trình tự mỗi được thiết kế bằng phần mềm Primer3. Trình tự của gen đích *Leptospira* spp. được lấy từ cơ sở dữ liệu trình tự của GenBank (số truy cập của trình tự là JN683900.1).

Phản ứng RPA: tổng thể tích phản ứng được sử dụng là 20 µl gồm các thành phần có nồng độ như đề xuất của nhà sản xuất (TwistAmp exo), trong đó nồng độ primer, probe tối ưu lần lượt là 0,42 µM và 0,06 µM với thể tích template là 2 µl. Phản ứng được thực hiện ở 38°C trong 30 phút trên thiết bị Genie®II.

Phản ứng realtime PCR: phản ứng realtime PCR (Primerdesign) được thực hiện với 5 µl PrecisionPLUS 2X qPCR Master Mix, 0,5 µl *Leptospirosis* primer/probe mix, 2 µl template và 2,5 µl nước. Phản ứng được thực hiện trên thiết bị Rotor-GeneQ với chu trình nhiệt gồm các bước: biến tính ban đầu 95°C trong 2 phút, sau đó là 50 chu kỳ gồm 2 bước (biến tính ở 95°C 10s và thu nhận tín hiệu 60°C 60s qua kênh FAM). Phản ứng đối chứng dương sử dụng DNA chứng dương do bộ kit cung cấp, đối chứng âm nước.

Kết quả

Trình tự primer, probe đặc hiệu gen đích lipL32

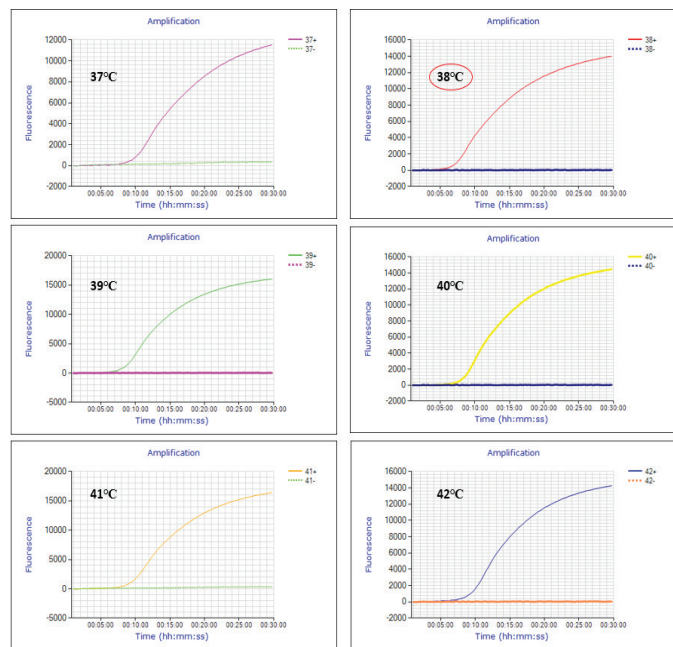
Căn cứ trên báo cáo về tính đa hình các gen của *Leptospira* spp. lưu hành trên thế giới và Việt Nam, nhóm nghiên cứu lựa chọn gen đích *lipL32* làm khuôn để thiết kế bộ công cụ primer/probe dùng cho kỹ thuật RPA. Bộ primer/probe được đánh giá khả năng bắt cặp đặc hiệu và các thông số cần thiết bằng công cụ BLAST, kết quả cho thấy sự bắt cặp rất tốt. Kết quả thực hiện phản ứng RPA với cặp primer/probe đã thiết kế cho thấy cường độ tín hiệu huỳnh quang và thời gian thu nhận tín hiệu khá tốt (bảng 1).

Bảng 1. Trình tự primer/probe trong phản ứng RPA phát hiện *Leptospira* spp. gây bệnh.

Primer/probe	Trình tự (5'-3')
Forward primer	AAAACCTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAAT
Reverse primer	AGACCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTTTCAC
Probe	AAAACCTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAAT-(FAM-dT)-T-(THF)-T-(BHQ1-dT)-TCACTACCTA-blocker

Tối ưu nhiệt độ phản ứng RPA

Dải nhiệt độ phản ứng từ 37-42°C được khảo sát để chọn ra nhiệt độ phản ứng RPA tối ưu. Kết quả chỉ ra trong hình 1 cho thấy nhiệt độ phản ứng tối ưu là 38°C với thời gian phát hiện sản phẩm khuếch đại sớm nhất (8 phút).



Hình 1. Tối ưu nhiệt độ phản ứng RPA khuếch đại DNA *Leptospira* spp.

Các phản ứng chứng dương cùng lượng khuôn DNA; phản ứng chứng âm không có khuôn DNA với nồng độ primer là 0,42 µM, nồng độ probe là 0,12 µM.

Tối ưu thành phần phản ứng RPA phát hiện *Leptospira* spp. gây bệnh

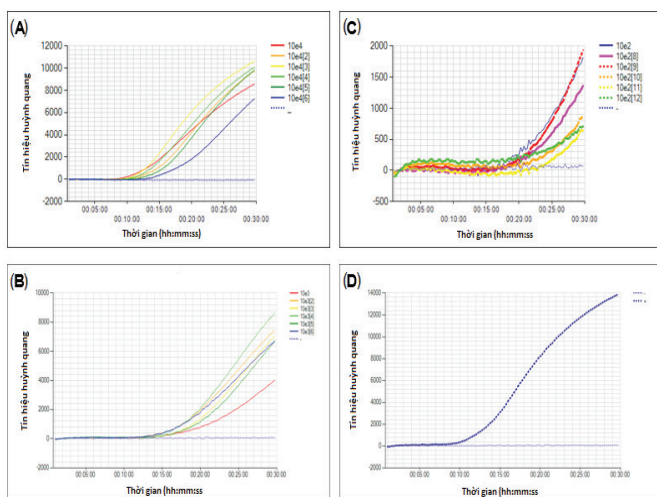
Các thành phần phản ứng bao gồm nồng độ môi, nồng độ probe và nồng độ Magnesium-Acetate (MgOAc) được chúng tôi tiến hành tối ưu để cải thiện hiệu suất khuếch đại của phản ứng. Dải nồng độ môi 0,24 µM, 0,36 µM, 0,42 µM và 0,54 µM; dải nồng độ probe 0,06 µM, 0,09 µM, 0,12 µM và dải nồng độ MgOAc từ 12-20 mM được khảo sát. Kết quả tối ưu được tổng hợp trong bảng 2 cho thấy, nồng độ môi tối ưu là 0,42 µM, nồng độ probe tối ưu là 0,09 µM và nồng độ MgOAc tối ưu là 14 mM.

Bảng 2. Thành phần phản ứng RPA khuếch đại DNA *Leptospira* spp. tối ưu (thể tích phản ứng là 20 µl).

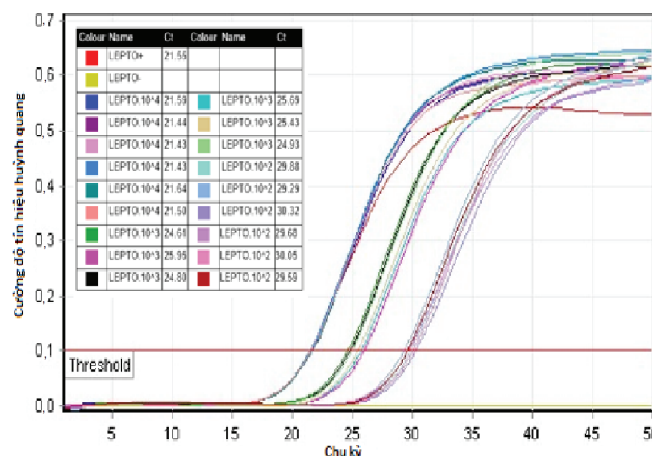
STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích
1	Reaction Buffer	1x	10 µl
2	dNTPs	1,8 mM	1,44 µl
3	H ₂ O		0,36 µl
4	Probe E-mix	1x	2 µl
5	Primer 872	0,42 µM	0,84 µl
6	Primer 432	0,42 µM	0,84 µl
7	Probe 174p	0,06 µM	0,12 µl
8	Core Reaction Mix	1x	1 µl
9	Exo	1x	0,4 µl
10	Template		2 µl
11	MgOAc	14 mM	1 µl

Ngưỡng phát hiện tương đương với quy trình realtime PCR (Primerdesign)

Panel dài nồng độ plasmid tái tổ hợp *Leptospira interrogans serovar Australis* nồng độ 10²-10⁴ copy/p.u được sử dụng để đánh giá ngưỡng phát hiện quy trình RPA đã xây dựng và quy trình realtime PCR của bộ kit *Leptospirosis* outer membrane protein *lipL32* gene (Primerdesign), mỗi nồng độ được lặp lại 6 lần. Kết quả cho thấy, quy trình RPA có khả năng phát hiện 6/6 lần lặp lại nồng độ 100 copy/p.u, tương đương với quy trình realtime PCR (Primerdesign). Hình 2, 3 lần lượt là kết quả đánh giá ngưỡng phát hiện quy trình RPA phát hiện *Leptospira interrogans serovar Australis*, kết quả đánh giá ngưỡng phát hiện quy trình realtime PCR (Primerdesign).



Hình 2. Kết quả đánh giá ngưỡng phát hiện quy trình RPA phát hiện *Leptospira interrogans serovar Australis*. (A) - nồng độ 10⁴ copy/p.u; (B) - nồng độ 10³ copy/p.u; (C) - nồng độ 10² copy/p.u; (D) - đối chứng âm/đối chứng dương.



Hình 3. Đánh giá ngưỡng phát hiện quy trình realtime PCR (Primerdesign) phát hiện *Leptospira interrogans serovar Australis*.

So sánh về thời gian phát hiện tương ứng các nồng độ của từng quy trình (bảng 3) cho thấy, quy trình RPA không những có khả năng phát hiện được mẫu DNA của *Leptospira interrogans serovar Australis* tương đương với quy trình realtime PCR mà còn cho phép phân tích kết quả nhanh hơn rất nhiều (23,17 phút) ở điều kiện đẳng nhiệt (38°C).

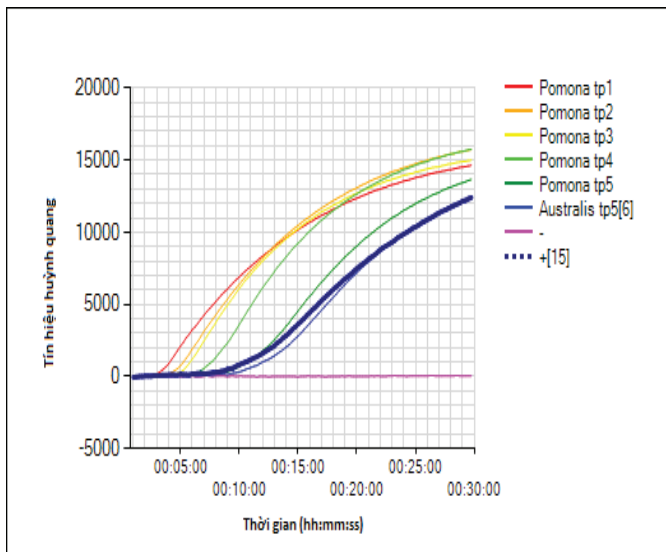
Bảng 3. So sánh thời gian phát hiện tương ứng các nồng độ của từng quy trình phát hiện *Leptospira interrogans serovar Australis*.

Nồng độ (copy/p.u)	Thời gian khuếch đại trung bình	
	Realtime PCR (chu kỳ ≈ phút *)	RPA (phút)
10 ⁴	21,50 ≈ 28,47	14,67
10 ³	25,24 ≈ 33,09	18,17
10 ²	29,80 ≈ 38,72	23,17

Chú thích: (*) với n là số chu kỳ, thời gian (phút) phát hiện sản phẩm khuếch đại quy trình realtime PCR được quy đổi ≈ thời gian biến tính ban đầu 2 phút + n x (70s mỗi chu kỳ + 1,75s thời gian giảm nhiệt (20°C/s) + (n-2) x 7/3s thời gian gia nhiệt (15°C/s)/60.

Độ nhạy trên các mẫu dương tính giả định với các serovar khác nhau cho kết quả tương đương với bộ kit thương mại

Đánh giá trên các mẫu dương tính giả định nồng độ khác nhau của 2 serovar *Leptospira* spp. gây bệnh *Leptospira interrogans serovar Pomona* (Pomona tp1-tp10), *Leptospira interrogans serovar Australis* (Australis tp1-tp10) cho thấy, quy trình RPA có khả năng phát hiện 20/20 mẫu bệnh phẩm dương tính giả định, tương đương với độ nhạy 100%. Độ nhạy này là tương đương với quy trình realtime PCR của bộ kit thương mại hiện hành (Primerdesign). Hình 4 là kết quả đánh giá độ nhạy quy trình RPA trên một số mẫu dương tính giả định với *Leptospira interrogans serovar Pomona*.



Hình 4. Kết quả đánh giá độ nhạy quy trình RPA trên một số mẫu dương tính giả định với *Leptospira interrogans serovar Pomona*.

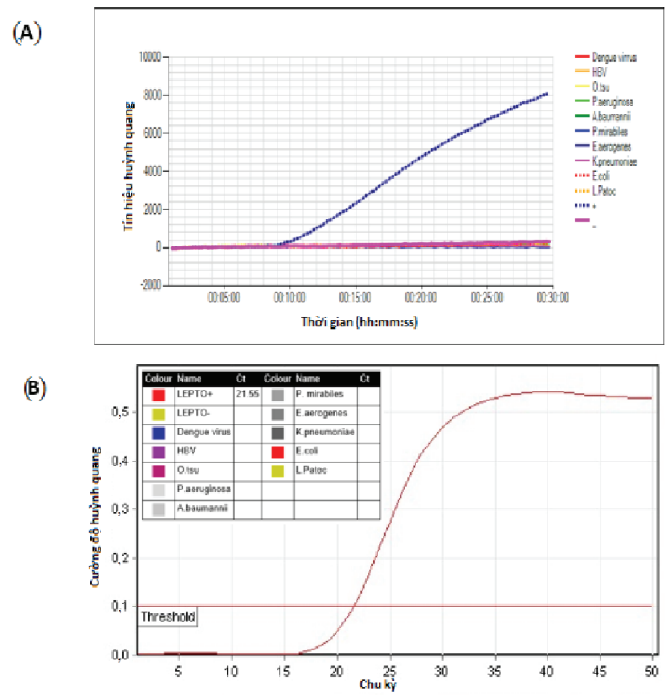
Độ đặc hiệu tương đương với bộ kit thương mại hiện có trên thị trường

Độ đặc hiệu quy trình RPA được đánh giá trên DNA các mẫu âm tính với *Leptospira spp.* và các chủng vi sinh vật thường gặp trong chẩn đoán phân biệt, đặc biệt có 1 chủng *Leptospira biflexa serovar Patoc* không gây bệnh (đã mô tả ở trên). Kết quả đánh giá độ đặc hiệu của quy trình RPA đã xây dựng được so sánh với bộ kit thương mại Leptospirosis outer membrane protein lipL32 gene kit qua một chuỗi các phản ứng realtime PCR tương ứng. Kết quả được trình bày ở bảng 4 và hình 5.

Quy trình RPA đã xây dựng không phát hiện bất kỳ mẫu nào trong 10 mẫu âm tính với *Leptospira spp.* và trên 10 mẫu DNA các chủng vi sinh vật khác thường gặp trong chẩn đoán phân biệt, tương đương với độ đặc hiệu 100%. Quy trình realtime PCR (Primerdesign) cũng cho kết quả đánh giá độ đặc hiệu tương đương (bảng 4).

Bảng 4. So sánh độ đặc hiệu của từng quy trình.

Mẫu đánh giá	Độ đặc hiệu (%)	
	Realtime PCR	RPA
Đánh giá trên mẫu bệnh phẩm âm tính với <i>Leptospira spp.</i>	100	100
Đánh giá trên chủng <i>Leptospira</i> không gây bệnh và các vi sinh vật có thể gây triệu chứng tương tự	100	100



Hình 5. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu từng quy trình phát hiện *Leptospira spp.* gây bệnh.

Quy trình RPA (A) và quy trình realtime PCR (Primerdesign) (B) trên chủng *Leptospira* không gây bệnh và các chủng vi sinh vật khác thường gặp trong chẩn đoán phân biệt leptospirosis.

Bàn luận

Tác nhân gây bệnh leptospirosis được xác định lần đầu tiên ở nước ta vào năm 1930 và Việt Nam được xem là khu vực đặc hữu của bệnh với đỉnh điểm diễn ra vào mùa mưa [13]. Tuy chưa có số liệu chính thức cho thấy dịch bệnh bùng phát ở Việt Nam nhưng các nghiên cứu gần đây vẫn cho thấy mức độ lưu hành cao của *Leptospira spp.* và nguy cơ tiềm tàng của nhiễm trùng leptospirosis [14, 15]. Do vậy, xây dựng các phương pháp phát hiện nhanh và chính xác tác nhân gây bệnh leptospirosis sẽ hỗ trợ cho công tác chẩn đoán, giám sát và cảnh báo dịch bệnh, đặc biệt là ở các quốc gia đang phát triển và được cho là vùng đặc hữu của bệnh như Việt Nam.

Trong nghiên cứu này, quy trình khuếch đại đẳng nhiệt RPA lần đầu tiên ở Việt Nam phát hiện *Leptospira spp.* gây bệnh đã được nghiên cứu và xây dựng thành công. Quy trình phản ứng được thực hiện ở điều kiện đẳng nhiệt 38°C, trên thiết bị Genie® II chỉ trong vòng 30 phút mà không cần sử dụng đến thiết bị luân nhiệt tinh vi với giá thành cao như PCR. Thiết bị được sử dụng là Genie® II với thiết kế nhỏ gọn, nhẹ và dễ dàng mang đi, phù hợp để thực hiện bất kỳ phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt nào phát hiện sản phẩm khuếch đại qua thu nhận tín hiệu huỳnh quang. Thiết bị này yêu cầu năng lượng thấp và sử dụng pin Lithium-polymer có thể sạc lại và giữ cho máy hoạt động cả ngày nên có thể dễ dàng mang đi. Nếu quy trình realtime PCR cần ít nhất 2 giờ để phân tích kết quả thì quy trình

RPA chỉ cần 30 phút để đưa ra kết quả chính xác cho một mẫu cần phân tích, rút ngắn đáng kể thời gian phát hiện tác nhân gây bệnh.

Ngưỡng phát hiện quy trình RPA đạt được là 100 copy/p.u, ngưỡng phát hiện này là tương đương với quy trình realtime PCR bộ kit Leptospirosis outer membrane protein *lipL32* gene của hãng Primerdesign nhưng với thời gian phát hiện nhanh hơn rất nhiều (bảng 3). Ngoài ra, ngưỡng phát hiện của xét nghiệm RPA còn được biết đến là không bị giới hạn, nhiều nghiên cứu đã chứng minh khả năng phát hiện sản phẩm được khuếch đại của công nghệ RPA là chỉ từ một phân tử DNA duy nhất [16].

Độ nhạy quy trình RPA được đánh giá trên các mẫu dương tính giả định với các nồng độ khác nhau của 2 serovar gây bệnh phổ biến nhất ở Việt Nam là *Leptospira interrogans* serovar *Australis* và *Leptospira interrogans* serovar *Pomona* [17]. Kết quả cho thấy, 20/20 mẫu dương tính giả định với 2 serovar gây bệnh đều được phát hiện chỉ trong 30 phút phản ứng, tương đương với độ nhạy 100%.

Bên cạnh đó, quy trình RPA đã thiết lập cũng cho thấy độ đặc hiệu rất cao (100%), tương đương với bộ kit thương mại Primerdesign ngay cả khi đánh giá trên chủng *Leptospira* không gây bệnh, các mẫu bệnh phẩm âm tính và trên các chủng vi sinh vật có thể gây ra một số triệu chứng tương tự. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu quy trình RPA là như mong đợi, với việc sử dụng probe làm tăng tính đặc hiệu của phản ứng. Việc lựa chọn gen đích *lipL32* chỉ có mặt ở các chủng *Leptospira* spp. gây bệnh cũng góp phần làm tăng tính đặc hiệu quy trình RPA. Như vậy, quy trình RPA đã xây dựng không những có ngưỡng phát hiện tương đương mà còn đạt được độ nhạy, độ đặc hiệu tương đương với bộ kit thương mại hiện có trên thị trường, cho thấy khả năng ứng dụng trong lâm sàng phát hiện *Leptospira* spp. gây bệnh.

Mặc dù quy trình RPA được tối ưu trong nghiên cứu này mới ở mức phát hiện định tính mà chưa phải là định lượng, nhưng với ngưỡng phát hiện đạt được rất tốt và độ nhạy, độ đặc hiệu cao gợi ý rằng có thể sử dụng quy trình này ở các điều kiện thực tế mà không cần trải qua các công đoạn làm giàu mẫu bệnh phẩm nhằm tăng độ nhạy như các kỹ thuật khuếch đại gen dựa trên phản ứng luân nhiệt đang sử dụng. Với thời gian phát hiện nhanh và các thông số kỹ thuật tương đương với bộ kit hiện hành, quy trình đẳng nhiệt đã thiết lập hứa hẹn là công cụ chẩn đoán hữu hiệu có khả năng ứng dụng trong các phòng thí nghiệm được trang bị hiện đại, phòng thí nghiệm di động hoặc khu vực có điều kiện hạn chế về trang thiết bị cơ sở hạ tầng, giúp chẩn đoán tác nhân gây bệnh leptospirosis.

Kết luận

Nghiên cứu đã thiết lập thành công quy trình đẳng nhiệt RPA đầu tiên tại Việt Nam, cho phép phát hiện nhanh và chính xác *Leptospira* gây bệnh với ngưỡng phát hiện, độ nhạy, độ đặc hiệu tương đương với bộ kit thương mại hiện có trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.A. Stoddard (2013), "Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the *lipL32* gene", *Methods Mol. Biol.*, **943**, pp.257-266.
- [2] D.A. Haake and P.N. Levett (2015), "Leptospirosis in humans", *Curr. top Microbiol. Immunol.*, **387**, pp.65-97.
- [3] H.S. Lee, et al. (2017), "Sero-prevalence of specific *Leptospira* serovars in fattening pigs from 5 provinces in Vietnam", *BMC Vet. Res.*, **13(1)**, p.125.
- [4] P.N. Levett (2001), "Leptospirosis", *Clin. Microbiol. Rev.*, **14(2)**, pp.296-326.
- [5] S.V. Budihal and K. Perwez (2014), "Leptospirosis diagnosis: competency of various laboratory tests", *J. Clin. Diagn. Res.*, **8(1)**, pp.199-202.
- [6] M.F. Palmer and W.J. Zochowski (2000), "Survival of leptospire in commercial blood culture systems revisited", *J. Clin. Pathol.*, **53(9)**, pp.713-714.
- [7] D. Musso and B. La Scola (2013), "Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge", *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **46(4)**, pp.245-252.
- [8] Ahmed Ahmed, Paul R. Klatser¹, and Rudy A. Hartskeerl (2012), "Molecular approaches in the detection and characterization of leptospira", *Journal of Bacteriology and Parasitology*, DOI:10.4172/2155-9597.1000e102.
- [9] L.M. Esteves, et al. (2018), "Diagnosis of human leptospirosis in a clinical setting: Real-time PCR high resolution melting analysis for detection of leptospira at the onset of disease", *Sci. Rep.*, **8(1)**, p.9213.
- [10] J. Kim and C.J. Easley (2011), "Isothermal DNA amplification in bioanalysis: strategies and applications", *Bioanalysis*, **3(2)**, pp.227-239.
- [11] P. Craw and W. Balachandran (2012), "Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review", *Lab on a Chip*, **12(14)**, pp.2469-2486.
- [12] I.M. Lobato and C.K. O'Sullivan (2018), "Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances", *Trac Trends in Analytical Chemistry*, **98**, pp.19-35.
- [13] K.T. Thai, et al. (2006), "Seroepidemiology of leptospirosis in southern Vietnamese children", *Trop. Med. Int. Health*, **11(5)**, pp.738-745.
- [14] C.T. Van, et al. (1998), "Human leptospirosis in the Mekong delta, Vietnam", *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **92(6)**, pp.625-628.
- [15] G. Pappas, et al. (2008), "The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends", *Int. J. Infect. Dis.*, **12(4)**, pp.351-357.
- [16] I.M.K. O'Sullivan (2018), "Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances", *Science Direct*.
- [17] Bộ Y tế (2017), *Bệnh xoắn khuẩn vàng da*, Cục Y tế Dự phòng.