

## QUY TRÌNH PHÁT HIỆN VI KHUẨN LAO *Mycobacterium tuberculosis* SỬ DỤNG HẠT TỬ NANO GẮN KHÁNG THỂ NHẪM TĂNG TÍNH ĐẶC HIỆU VÀ TỐC ĐỘ XỬ LÝ MẪU

Phạm Bảo Yên<sup>3,\*</sup>, Chủ Lương Luân<sup>1</sup>, Nguyễn Quang Đạo<sup>1</sup>, Nguyễn Minh Hiếu<sup>2</sup>,  
Nguyễn Hoàng Nam<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Vân Anh<sup>3</sup>, Phan Tuấn Nghĩa<sup>1,3</sup>,  
Nguyễn Hoàng Lương<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Trung tâm Khoa học Vật liệu, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội, Việt Nam

<sup>3</sup>Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, ĐHQG Hà Nội, Việt Nam

<sup>4</sup>Trung tâm Nano và Năng lượng, ĐHQG Hà Nội, Việt Nam

\*Email: cinaus@gmail.com

Đến Tòa soạn: 8/8/2013; Chấp nhận đăng: 14/4/2014

### TÓM TẮT

Vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) là nguyên nhân trực tiếp gây nên bệnh lao phổi ở những nước đang phát triển. Số bệnh nhân được chẩn đoán mắc lao đa kháng thuốc (MDR) gia tăng không ngừng trong những năm gần đây. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển một quy trình chẩn đoán mới sử dụng hạt tử nano chức năng hóa bề mặt với nhóm amino (NP-NH<sub>2</sub>) để gắn kết với kháng thể kháng lao nhằm xây dựng một phương pháp dựa trên phản ứng PCR có tính đặc hiệu cao hơn. Kết quả cho thấy, phức hệ NP-NH<sub>2</sub>- kháng thể tạo ra nhờ phản ứng gắn kết sử dụng EDC cho phép phát hiện *M. bovis* trong vaccine BCG nhanh chóng và đặc hiệu. Hệ gen của *M. bovis* có chứa trình tự IS6110 đặc trưng cho vi khuẩn lao và thường được sử dụng trong việc phát hiện vi khuẩn lao. Hơn nữa, khi được bảo quản trong đệm PBS-TBN ở 4 °C, sau 4 tuần, phức hệ này bền vững và cho kết quả ổn định. Chính vì vậy thời gian chuẩn bị mẫu cho phản ứng PCR có thể được giảm xuống dưới 1 giờ do không còn phải tinh sạch ADN. Nhóm nghiên cứu đã thử nghiệm khả năng ứng dụng của phương pháp chẩn đoán này trên mẫu bệnh phẩm đờm từ Viện Quân y 103 và bước đầu đã thu được kết quả như dự kiến. Các thí nghiệm sử dụng từ tính của phức hệ NP-NH<sub>2</sub>- kháng thể để phát triển bộ kit tự động hóa đang được tiến hành nhằm tăng tốc độ xử lý và giảm khả năng nhiễm chéo.

*Từ khóa:* hạt nano từ, phản ứng gắn kết sử dụng EDC, kháng thể kháng MTB, *Mycobacterium tuberculosis*, chẩn đoán bệnh lao.

### 1. MỞ ĐẦU

Những nỗ lực trong công cuộc phòng chống bệnh lao trên toàn thế giới đã bước đầu thu được một số thành quả như là giảm tỉ lệ mắc mới và tỉ lệ tử vong do lao. Theo báo cáo *Global*

*tuberculosis control* của Tổ chức Y tế Thế giới WHO năm 2011, lao phổi là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm gây tử vong cao nhất thế giới chỉ đứng sau HIV-AIDS [1].

Cũng theo Tổ chức Y tế Thế giới, Việt Nam là quốc gia có tỉ lệ nhiễm lao và lao đa kháng thuốc cao. Do chưa có phương pháp chẩn đoán lao chính xác và hiệu quả, rất nhiều trường hợp mắc lao và lao đa kháng thuốc không được phát hiện và chữa trị kịp thời [2]. Những năm đầu thập niên 90, một phương pháp chẩn đoán được phát triển dựa trên trình tự chèn (IS-insert sequence) IS 6110 trong hệ gen của vi khuẩn MTB và nhanh chóng được ứng dụng rộng rãi. Ưu điểm của phương pháp này là độ nhạy và tính đặc hiệu cao do sử dụng kỹ thuật PCR có khả năng nhận biết và sao chép khuếch đại về mặt số lượng đoạn IS 6110 [3, 4, 5]. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi thời gian tách chiết ADN từ từng mẫu bệnh phẩm và gặp khó khăn do tế bào MTB có cấu trúc thành tế bào rất phức tạp, do vậy quá trình ly giải tế bào MTB thường ít có hiệu quả [6].

Những năm gần đây, sự kết hợp giữa hai ngành vật lý và sinh học đã tạo tiền đề cho việc chế tạo thành công một hệ thống bán tự động, sử dụng vật liệu nano để tách chiết axit nucleic từ tế bào [7]. Các hạt có kích thước nano mang từ tính cho phép thao tác cùng lúc với nhiều mẫu bệnh phẩm trên đĩa PCR 96 giếng, giúp tăng đáng kể tốc độ chẩn đoán và giảm thiểu yếu tố ngoại nhiễm cũng như nguy cơ phơi nhiễm đối với cán bộ xét nghiệm, đặc biệt là trong trường hợp xét nghiệm, chẩn đoán bệnh truyền nhiễm nguy hiểm như lao. Không những thế, loại vật liệu này còn có thể được liên kết với kháng thể đặc hiệu, tăng tính chính xác cho phương pháp chẩn đoán [8]. Năm 2012, Lisi và cộng sự đã thiết kế một hệ thống phát hiện nhanh virus Hendra dựa trên liên kết đặc hiệu kháng nguyên - kháng thể có gắn chất đánh dấu huỳnh quang [9]. Đáng chú ý hơn, sự kết hợp giữa tính đặc hiệu của liên kết kháng nguyên - kháng thể, độ nhạy cùng tính chính xác cao của kỹ thuật PCR có thể làm tăng rõ rệt khả năng phát hiện chủng *Salmonella* trong dịch huyền phù hỗn hợp vi khuẩn [10].

Trong bài báo này, chúng tôi lần đầu tiên giới thiệu phương pháp chẩn đoán lao sử dụng hạt nano từ được chức năng hóa bề mặt với nhóm amino - liên kết với kháng thể kháng MTB nhờ chất xúc tác liên kết EDC và trình bày kết quả thử nghiệm bước đầu trên mẫu bệnh phẩm (đờm và dịch súc họng). Kết quả nghiên cứu mở ra tiềm năng phát triển một hệ thống chẩn đoán lao nhanh, có độ chính xác cao và hoàn toàn tự động.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Gắn kháng thể kháng MTB

Hạt nano từ là các hạt oxit sắt từ  $Fe_3O_4$  được chế tạo bằng phương pháp đồng kết tủa dung dịch sắt (III) clorua và sắt (II) clorua với xúc tác  $NH_3$ . Hạt nano tạo thành được đưa vào dung dịch tetraethoxysilane (TEOS) để bọc silica. Huyền phù chứa hạt từ nano bọc silica tiếp tục được chuyển vào dung dịch aminopropyl triethoxysilane (APTS) để gắn nhóm amino lên hạt. Nồng độ nhóm  $-NH_2$  ở vào khoảng xấp xỉ 24 nmol/mg hạt từ. Thành phẩm hạt từ gắn nhóm amino ở dạng huyền phù trong nước với nồng độ 5 mg/ml. Trước khi bắt đầu quy trình chẩn đoán, lấy 50  $\mu$ l dung dịch hạt từ, rửa 3 lần với đệm liên kết (phosphate buffered saline PBS, pH 6,5). Sau lần rửa cuối, ủ hạt cùng 71  $\mu$ l đệm liên kết PBS, 2  $\mu$ l kháng thể (nồng độ 7 mg/ml) và 2  $\mu$ l EDC (nồng độ gốc 250 mg/ml, Sigma). Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút để phản ứng liên kết diễn ra. Sau 30 phút, hút bỏ phần dịch trong; phần hạt đã được liên kết kháng thể được sử dụng để làm giàu *Mycobacterium* như trình bày dưới đây [11].

Trong thí nghiệm thử độ bền vững của phức hệ hạt từ - kháng thể, một thể tích tương đương 10 phản ứng được bảo quản trong đệm PBS-TBN, pH 7,4 (dung dịch PBS bổ sung

0,01 % Tween-20, 0,1 % BSA và 0,05 M  $\text{NaN}_3$ ) và giữ ở 4 °C. Tại mỗi thời điểm thử nghiệm, rút ra một thể tích tương đương 1 phản ứng để tiến hành làm giàu vi khuẩn *Mycobacterium*.

## 2.2. Làm giàu vi khuẩn lao, ly giải tế bào và khuếch đại đoạn IS6110

Hạt từ amino gắn kháng thể kháng MTB được ủ với 50  $\mu\text{l}$  mẫu (mẫu đờm hoặc vắc xin BCG) trong 45 phút ở nhiệt độ phòng. Chú ý: mẫu bệnh phẩm đờm cần được khử nhiễm với N-acetyl L-cysteine (NALC) và NaOH. Sau thời gian ủ, hút bỏ phần dịch trong rồi thêm 50  $\mu\text{l}$  đệm TE (Tris-EDTA: 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5). Ủ hỗn hợp ở 100 °C trong 15 phút [12]. Sau khi bỏ hạt từ, ADN trong phần dịch trong được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR sử dụng cặp mồi thiết kế đặc hiệu cho đoạn IS 6110 (cung cấp bởi IDT) với chu trình nhiệt  $1 \times 95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 phút;  $40 \times (95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 40 giây;  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 giây;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 giây);  $1 \times 72 \text{ }^\circ\text{C}$ , 7 phút;  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\infty$ . Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2 %.

## 2.3. Phân tích thâm tách miễn dịch điểm (dot-blot)

Màng Hybond (cung cấp bởi Amersham) được sử dụng để phân tích thâm tách miễn dịch điểm. Vắc xin BCG (hoặc mẫu bệnh phẩm đờm đã xử lý) được chấm lên màng (đã xử lý bằng methanol và cân bằng với nước). Đợi mẫu khô, đem màng xử lý với 5 % BSA PBS-T để tránh liên kết không đặc hiệu, rửa 3 lần (mỗi lần rửa 10 phút bằng nước cất) sau đó ủ với kháng thể sơ cấp (kháng thể kháng MTB, Abcam, pha loãng 1 : 10000) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa 10 phút rồi tiếp tục ủ màng với kháng thể thứ cấp (Kháng thể anti-mouse gắn Alkaline Phosphatase, Promega, pha loãng 1 : 4000) trong 1 giờ, nhiệt độ phòng). Cuối cùng, dùng cơ chất BCIP/NBT trong đệm AP để hiện màu.

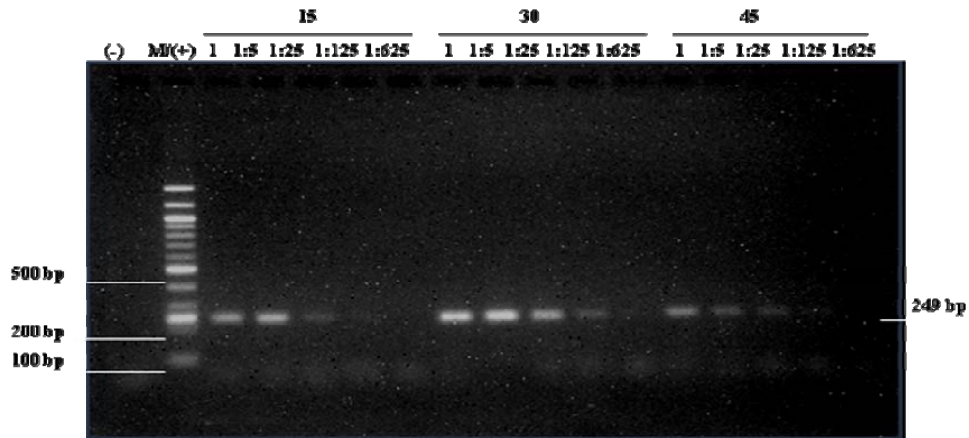
# 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

## 3.1. Tác nhân liên kết EDC và tối ưu hóa thời gian phản ứng liên kết

Hạt từ nano được gắn nhóm amino nhằm mục đích tạo liên kết với nhóm carboxyl trên phân tử kháng thể. 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC, hay còn gọi EDAC) được chọn làm tác nhân tạo liên kết trực tiếp giữa hạt từ và kháng thể kháng MTB. EDC bị thủy phân và bất hoạt rất nhanh trong dung dịch. Tuy nhiên hiệu suất của phản ứng liên kết vẫn có thể tăng lên bằng cách điều chỉnh nồng độ các chất tham gia phản ứng, thành phần đệm liên kết và pH của đệm. Chúng tôi thử nghiệm ba hệ thống đệm: PBS, MES (2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid) và ethanol ở 5 pH (4,5; 5,5; 6,0; 6,5 và 7,4). Theo Nam và cộng sự [13] sử dụng hệ thống đệm ethanol có thể làm chậm quá trình thủy phân EDC. Mặt khác, chúng tôi sử dụng các nồng độ EDC và tỉ lệ EDC/kháng thể khác nhau. Điều kiện tối ưu cho phản ứng liên kết là đệm PBS pH 6,0 với nồng độ cuối cùng của EDC và kháng thể kháng MTB là 6,7 mg/ml và 0,2 mg/ml (kết quả không trình bày tại đây). Tuy nhiên, tốc độ phản ứng liên kết giữa nhóm amino và nhóm carboxyl của phân tử kháng thể phụ thuộc pKa của phân tử, vì vậy đối với kháng thể khác, điều kiện tối ưu cho phản ứng có thể thay đổi.

Như đã nhắc tới ở trên, sự thủy phân nhanh chóng của EDC trong dung dịch làm giảm đáng kể hiệu suất của quá trình liên kết. Chúng tôi tiến hành các thí nghiệm tối ưu thời gian phản ứng liên kết, và đưa đến kết quả: thời gian tối ưu cho phản ứng là 30 phút (hình 1). Đối với phản ứng có thời gian ủ 120 phút, hầu như không thể quan sát thấy tín hiệu hiện trên gel agarose – cho thấy lượng khuôn ADN, đồng nghĩa với lượng tế bào vi khuẩn gắn vào phức hệ hạt từ - kháng thể là rất ít, do liên kết EDC không hiệu quả. Các thí nghiệm cũng cho thấy nhiệt độ ủ phản ứng

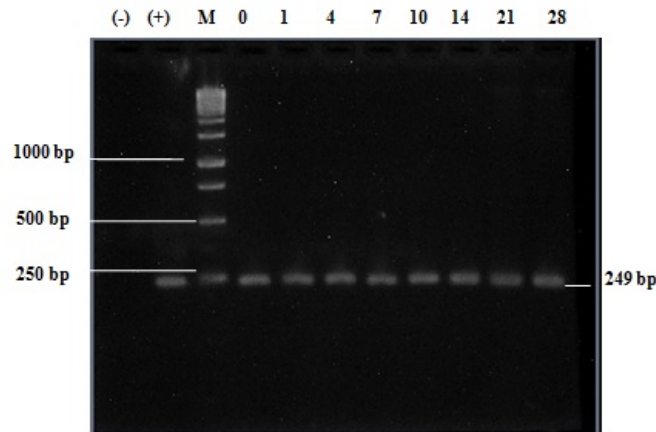
cũng có ảnh hưởng đến quá trình liên kết (kết quả không trình bày tại đây); nhiệt độ tối ưu cho phản ứng liên kết là 22 °C.



Hình 1. Tối ưu hóa thời gian ủ phản ứng liên kết tạo phức hệ hạt từ - kháng thể (thứ tự mẫu: đối chứng âm, thang chuẩn 100 bp / đối chứng dương, phức hệ với thời gian ủ 15, 30 và 45 phút với vắc xin BCG pha loãng tỉ lệ 1, 1:5, 1:25, 1:125 và 1:625).

### 3.2. Hiệu suất phản ứng liên kết và độ bền vững của phức hệ hạt từ amino - kháng thể

Để thử độ bền vững của phức hệ hạt từ - kháng thể, một thể tích tương đương 10 phản ứng liên kết được bảo quản trong đệm PBS-TBN; tại mỗi thời gian thử nghiệm, lấy một thể tích cho 1 phản ứng để làm giàu vi khuẩn (chi tiết xem trong phần 2 phương pháp). Kết quả ở hình 2 cho thấy, phức hệ vẫn ổn định sau 28 ngày. Lượng khuôn ADN thể hiện cho số lượng vi khuẩn gắn được trên hạt gần như không thay đổi trong thời gian thử nghiệm. Tính bền vững của phức hệ là một lợi thế và đây là cơ sở cho việc chế tạo bộ kit chẩn đoán nhanh sử dụng trong các phòng khám lao.



Hình 2. Thử độ bền vững của phức hệ hạt từ - kháng thể (thứ tự mẫu: đối chứng âm, đối chứng dương, thang chuẩn 1 kb, phức hệ sử dụng tại mỗi mốc thời gian thử nghiệm từ 0 - 28 ngày).

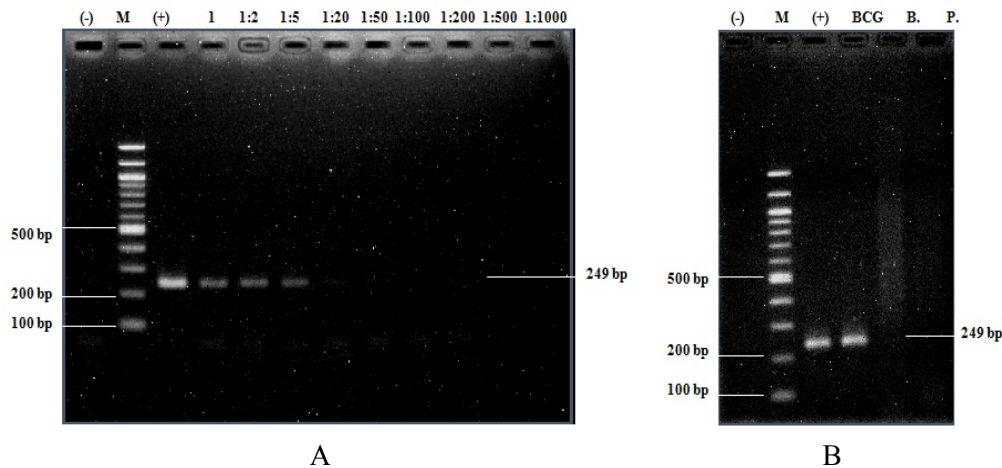
Một tiêu chí khác để đánh giá hiệu suất của quá trình liên kết là lượng kháng thể không gắn hạt còn lại trong phần dịch trong. Chỉ số OD<sub>280</sub> đo được thường ở mức xấp xỉ 0, nghĩa là hầu như

toàn bộ kháng thể đã tham gia gắn kết lên hạt từ amino. Tuy nhiên, kết quả phân tích thẩm tách miễn dịch điểm (dựa trên phản ứng màu của kháng thể thứ cấp gắn alkaline phosphatase) cho thấy lượng kháng thể kháng MTB gắn lên hạt chỉ vào khoảng 85 % (kết quả không trình bày tại đây). Có thể giải thích sự chênh lệch giữa 2 kết quả đo này là do hệ thống AP có độ nhạy cao và ít bị ảnh hưởng nhiều so với đo bằng máy quang phổ kế.

### 3.3. Độ đặc hiệu và độ nhạy của quy trình chẩn đoán lao thử nghiệm trên vắc xin BCG

Chúng tôi sử dụng vắc xin thương mại BCG (cung cấp dưới dạng bột) để tiến hành thử nghiệm quy trình chẩn đoán. Mỗi ống vắc xin được thêm nước cất khử trùng, khử ion tới thể tích cuối cùng 0,5 ml. Có thể ước tính nồng độ vi khuẩn bằng phương pháp của Sutton [14]. Để đánh giá độ nhạy của phương pháp, chúng tôi kiểm tra với các nồng độ pha loãng BCG. Kết quả cho thấy (hình 3A), ở nồng độ pha loãng 100 lần, băng sản phẩm nhân đoạn IS6110 vẫn có thể quan sát thấy trên bản gel agarose. So với phương pháp đang sử dụng trong phòng thí nghiệm gồm hai quá trình là tách chiết ADN và khuếch đại đoạn IS6110 không sử dụng kháng thể kháng MTB, phương pháp này có độ nhạy cao hơn 10 lần. Tuy nhiên, cặp môi đặc hiệu cho đoạn IS6110 có thể phát hiện một lượng chỉ 10 femtogram hoặc lượng tương đương với 3 bộ genome của vi khuẩn. Các thử nghiệm tối ưu vẫn đang tiếp tục được tiến hành để tăng độ nhạy cho phương pháp.

Độ đặc hiệu, hay chính là khả năng giảm thiểu tín hiệu nhiễu, là một tiêu chí quan trọng để đánh giá hiệu quả của một phương pháp chẩn đoán. Mẫu bệnh phẩm (phần lớn được sử dụng là bệnh phẩm đờm) thường có chứa cả các vi sinh vật khác có thể gây nhiễu cho kết quả chẩn đoán. Đối với mẫu bệnh phẩm đờm lao, có thể xử lý khử nhiễm bằng N-acetyl L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH). Tuy nhiên, phương pháp này không loại bỏ được hoàn toàn các yếu tố gây nhiễu nếu có. Bên cạnh cặp môi thiết kế đặc hiệu để khuếch đại trình tự IS6110, kháng thể kháng MTB hoạt động như một cái sàng, chỉ giữ lại kháng nguyên MTB. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kháng thể kháng MTB đa dòng, nhằm tăng tối đa sự gắn kết của các loại kháng nguyên trên bề mặt vi khuẩn MTB.



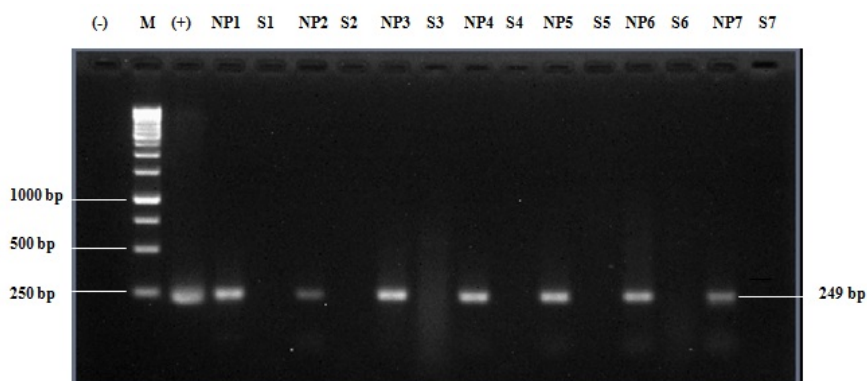
Hình 3. A: Độ nhạy của cặp môi thiết kế đặc hiệu để khuếch đại trình tự IS6110 (thứ tự mẫu: đối chứng âm, thang chuẩn 100 bp, đối chứng dương, mẫu BCG pha loãng tỉ lệ  $10^0$  đến  $10^{-3}$ ) B: Độ đặc hiệu của kháng thể kháng MTB và cặp môi thiết kế cho đoạn IS6110 (thứ tự mẫu: đối chứng âm, thang chuẩn 100 bp, đối chứng dương, mẫu BCG, mẫu vi khuẩn: B. - *Bacillus licheniformis*, P. - *Pseudomonas mendocina*).

Độ đặc hiệu của quy trình được kiểm tra bằng phương pháp thẩm tách miễn dịch và kỹ thuật PCR. Phức hệ hạt từ - kháng thể được sử dụng để làm giàu vi khuẩn đối với mẫu vi khuẩn lao, *B. licheniformis* và *P. mendocina*. Thí nghiệm phân tích thẩm tách miễn dịch điển hình cho thấy: phân màng thẩm vắc xin BCG giữ liên kết với kháng thể kháng MTB sau nhiều lần rửa, thể hiện ở màu tím của cơ chất AP trên màng. Kết quả PCR khi sử dụng cặp mồi thiết kế đặc hiệu cho đoạn IS6110 chỉ có một băng duy nhất ở 249 bp như dự tính đối với mẫu BCG và không cho sản phẩm khuếch đại với vi khuẩn *B. licheniformis* và *P. mendocina* (hình 3B).

### 3.4. Li giải tế bào *Mycobacterium* và tối ưu thời gian ủ

Li giải tế bào là bước rất quan trọng trong các quy trình tách chiết axit nucleic nói chung và quy trình chẩn đoán MTB nói riêng. Tế bào vi khuẩn MTB có cấu trúc thành tế bào đặc biệt, rất bền với chất tẩy, thuốc nhuộm và một số hóa chất thường sử dụng trong các đệm li giải. Có thể sử dụng phương pháp vật lý, hóa học và sinh học để li giải tế bào MTB; trong đó các dung môi hữu cơ cho hiệu quả cao nhất [6]. Tuy vậy, sử dụng hóa chất có tính độc hại cao yêu cầu các thao tác xử lý đặc biệt, có thể mất thêm rất nhiều thời gian. Năm 2002, Amita và cộng sự đã thực hiện thí nghiệm xử lý mẫu vi khuẩn MTB ở 100 °C và kết quả cho thấy tế bào vi khuẩn MTB được li giải gần như hoàn toàn [15]. Năm 2010, Awua K. A. và cộng sự đã so sánh các loại đệm được bổ sung với một số thành phần hỗ trợ li giải [16]. Để kiểm chứng hiệu quả của các loại đệm này, chúng tôi thử nghiệm li giải tế bào MTB với các loại đệm khác nhau có bổ sung các thành phần như SDS, Triton X-100, lysozyme, proteinase K, kết hợp với siêu âm phá tế bào, xử lý sốc nhiệt, đun sôi... Loại đệm đưa lại hiệu quả tốt nhất, sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo là đệm li giải có Tris-EDTA kết hợp xử lý mẫu ở 100 °C.

### 3.5. Thử nghiệm trên mẫu bệnh phẩm



Hình 4. Sử dụng phức hệ hạt từ-kháng thể để phát hiện sự có mặt của vi khuẩn MTB trong mẫu bệnh phẩm đờm (thứ tự mẫu: đối chứng âm, thang chuẩn 1 kb, đối chứng dương và mẫu bệnh phẩm số 1 - 7. Phần bám trên hạt NP và phần dịch trong S).

Mẫu bệnh phẩm đờm thường ở trạng thái nhớt, có thể cản trở sự tiếp xúc của phức hệ hạt từ - kháng thể tới vi khuẩn MTB (nếu có) trong bệnh phẩm. Do vậy, với các mẫu bệnh phẩm đã được chẩn đoán dương tính, trước tiên chúng tôi tiến hành siêu âm, sau đó làm giàu MTB bằng phương pháp sốc nhiệt (đóng băng ở -20 °C trong 20 phút trước khi đun sôi). Kết quả ở hình 4 cho thấy phức hệ hạt amino-kháng thể có khả năng gắn kết rất hiệu quả với vi khuẩn MTB trong mẫu bệnh phẩm, vì thế không hề có tín hiệu của đoạn IS6110 từ vi khuẩn còn lại trong phần dịch

trong đối với tất cả 7 mẫu thí nghiệm (giếng số 1 - 7). Thời gian để thực hiện toàn bộ quy trình chỉ xấp xỉ 1 giờ, nghĩa là bằng một nửa tổng thời gian tách chiết ADN theo phương pháp truyền thống. Thêm vào đó, quy trình cho phép sàng lọc một cách rất đặc hiệu nhờ kháng thể và đòi hỏi rất ít thao tác thực hiện so với quá trình tinh sạch ADN thông dụng, do vậy đã giảm được các bước rửa và li tâm. Điều này đồng thời tăng tốc độ chẩn đoán và giảm thiểu ngoại nhiễm. Tuy nhiên, để so sánh chính xác hiệu quả của hai phương pháp trên mẫu bệnh phẩm cần thêm các phân tích cụ thể bằng kỹ thuật real-time PCR.

#### 4. KẾT LUẬN

Chẩn đoán sớm bệnh lao đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong điều trị và ngăn ngừa bệnh lây lan. Hiện nay, nhờ sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại trình tự IS 6110 đặc trưng của vi khuẩn lao đã giúp chẩn đoán nhanh chỉ sau vài giờ. Bên cạnh đó, việc liên kết kháng thể kháng MTB lên hạt từ nano làm tăng rõ rệt tính đặc hiệu cho quy trình chẩn đoán. Do phức hệ hạt từ-kháng thể vẫn bền vững sau thời gian 1 tháng, có thể lược bỏ giai đoạn gắn kháng thể lên hạt từ cho mỗi lần chẩn đoán và vì vậy, giảm thời gian thực hiện toàn bộ quy trình xuống chỉ còn khoảng một nửa so với phương pháp tách chiết ADN truyền thống.

**Lời cảm ơn.** Nghiên cứu này được sự giúp đỡ từ Đề tài 2/2010/HD-NCCBUD của Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn các đồng nghiệp tại Viện Quân y 103 đã cung cấp mẫu bệnh phẩm sử dụng trong thực nghiệm.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. World Health Organization, Global tuberculosis control, WHO library, 2011.
2. World Health Organization, Tuberculosis profile of Vietnam, WHO library, 2011.
3. Kolk A. H. J., Kox L. F. F., Leeuwen J. V., Kuijper S., and Jansen H. M. - Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis, *European Respiratory Journal* **11** (1998) 1222–1226.
4. Kolk A. H., Schuitema A. R., Kuijper S., Leeuwen J. V., Hermans P. W., Embden J. D. V., and Hartskeerl R. A. - Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system, *J. Clin. Microbiol.* **30(10)** (1992) 2567-2575.
5. Kox L. F., Rienthong D., Miranda A. M., Udomsantisuk N., Ellis K., Leeuwen J. V., Heusden S. V., Kuijper S., and Kolk A. H. - A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples, *J. Clin. Microbiol.* **32** (3) (1994) 672–678.
6. Noordhoek G. T., Kolk A. H., Bjune G., Catty D., Dale J. W., Fine P. E. Godfrey-Faussett P., Cho S. N., Shinnick T., and Svenson S. B. - Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories, *J. Clin. Microbiol.* **32** (1994) 277-284.
7. Nguyen H. H., Nguyen C., Nguyen H. L., Nguyen T. V. A., Phan T. N., Mai A. T. - Proceedings of the 5<sup>th</sup> National Solid-State Physics Conference, Vung Tau, Vietnam, 2007.

8. Arruebo M., Valladares M., González-Fernández A. - Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications, *Journal of Nanomaterials* **2009** (2009) 1-24.
9. Lisi F., Falcaro P., Buso D., Anita J. H., Jennifer A. B., Cramer G., Tich L. N., Wang L. F., and Paul M. - Rapid Detection of Hendra Virus using Magnetic Particles and Quantum Dots, *Advanced Healthcare Materials* **1** (5) (2012) 631-634.
10. Padmavathy B., Patel A., Kumar R. V., and Ali B. M. J. - Superparamagnetic Nanoparticles Based Immunomagnetic Separation - Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Salmonella, *Science of Advanced Materials* **1** (2012) 114-120.
11. Hermanson G. T. - *Bioconjugate Techniques*, 2nd Edition, Elsevier Inc., Academic Press, London, Amsterdam, Burlington, San Diego, 2008.
12. Kubica G. P., Dye W. E., Cohn M. L., and Middlebrook G. - Sputum digestion and decontamination with N-Acetyl-l-cysteine sodium hydroxide for culture of bacteria, *American Review of Respiratory Diseases*. **87** (1963) 775-779.
13. Nam K., Kimura T., Kishida A. - Controlling coupling reaction of EDC and NHS for preparation of collagen gel using ethanol/water co-solvents, *Macromol Biosci.* **8** (1) (2008) 32-37.
14. Sutton S. - Measurement of microbial cells by optical density, *Journal of validation technology* **17** (1) (2011) 46-49.
15. Amita J., Vandana T., Guleria R. S., and Verma R. K. - Qualitative Evaluation of Mycobacterial DNA Extraction Protocols for Polymerase Chain Reaction, *Molecular Biology Today* **3** (2002) 43-50.
16. Awua K. A., Doe D. E., and Gyamfi K. O. - Evaluation of cost-effective total nucleic acids extraction protocols for cultured Mycobacterium tuberculosis; a comparison by PCR amplification of genes associated with drug resistance, *BMC Research Notes* **3** (48) (2010) 1-6.

#### ABSTRACT

#### SPECIFICITY AND PROCESSING RATE ENHANCEMENT OF *Mycobacterium tuberculosis* DIAGNOSTIC PROCEDURE USING ANTIBODY-COUPLED MAGNETIC NANOPARTICLES

Yen B. Pham<sup>3</sup>, Luan L. Chu<sup>1</sup>, Dao Q. Nguyen<sup>1</sup>, Hieu M. Nguyen<sup>2</sup>, Nguyen Hoang Nam<sup>2</sup>, Anh T.V. Nguyen<sup>3</sup>, Tuan-Nghia Phan<sup>1,3</sup>, Nguyen Hoang Luong<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>*Faculty of Biology, VNU University of Science, Hanoi, Vietnam*

<sup>2</sup>*Center for Materials Science, VNU University of Science, Hanoi, Vietnam*

<sup>3</sup>*Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, VNU University of Science, Hanoi, Vietnam*

<sup>4</sup>*Nano and Energy Center, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam*

Email: [cinaus@gmail.com](mailto:cinaus@gmail.com)



*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) causes one of the most dangerous lung diseases that hazard developing countries, with the number of patients diagnosed with multi-drug resistant (MDR) strains is increasing significantly. In this study, we have developed a new diagnostic procedure using magnetic nanoparticles functionalized with amino group (NP-NH<sub>2</sub>) to couple with anti-MTB antibody for a more specific PCR-based detection method. The results show that the NP-NH<sub>2</sub>-antibody complex generated through EDC coupling allows rapid and specific detection of *M. bovis* from the BCG vaccine which possesses the signature IS6110 sequence widely used in MTB diagnosis. Furthermore, as this complex is stable and provides reproducible detection for at least four weeks when stored in PBS-TBN buffer at 4 °C, the required time for the whole procedure to prepare samples for PCR could be completed within an hour due to the elimination of the DNA purification step. We have tested this method on sputum samples collected from Vietnam Hospital 103 and preliminarily validated its feasibility. Further experiments are underway to employ the magnetic feature of the NP-NH<sub>2</sub>-antibody complex to develop an automated kit which facilitates high throughput screening and reduces contamination risk.

**Keywords:** nanoparticles, EDC coupling, anti-MTB, *Mycobacterium tuberculosis*, MTB diagnosis.