



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0030363

(51)⁷ C12Q 1/68

(13) B

(21) 1-2018-05682

(22) 14/12/2018

(45) 25/12/2021 405

(43) 25/02/2020 383A

(73) Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Lã Thị Huyền (VN); Nguyễn Minh Hiền (VN); Nguyễn Thị Loan (VN); Nguyễn Trọng Linh (VN).

(54) KIT ĐỂ XÁC ĐỊNH NHANH NHÓM VI KHUẨN GÂY NHIỄM TRÙNG, ĐOẠN MÔI VÀ ĐOẠN DÒ DỪNG TRONG KIT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kit để xác định nhanh nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng bao gồm *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* dùng trong phương pháp realtime-PCR đa môi để phát hiện nhanh năm loài vi khuẩn gây nhiễm trùng thường gặp trong y tế. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến các đoạn môi và các đoạn dò đặc hiệu dùng trong kit này. Kit theo sáng chế hữu ích để phát hiện, kiểm tra các loài vi khuẩn có nguy cơ gây nhiễm khuẩn ở nơi cần kiểm soát nhiễm trùng, đặc biệt là trong các bệnh viện và những nơi kiểm soát y tế công cộng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, công nghệ di truyền ứng dụng trong phân tích bệnh học, cụ thể là sáng chế đề cập đến kit để xác định nhanh nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng thường gặp trong y tế, các đoạn mồi đặc hiệu và đoạn dò dùng trong kỹ thuật realtime-PCR đa mồi để phát hiện đồng thời nhóm năm loài vi khuẩn gây nhiễm trùng y tế bao gồm *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* và *Staphylococcus aureus*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong y tế, việc phát hiện, ngăn ngừa các bệnh nhiễm trùng là vấn đề ưu tiên hàng đầu. Đặc biệt trong y tế cộng đồng và các bệnh viện, việc phát hiện, ngăn ngừa các vi khuẩn gây nhiễm trùng là công việc cấp thiết, giúp giảm được nguy cơ lây nhiễm chéo trong cộng đồng. Hiện nay, phương pháp phổ biến để phát hiện vi khuẩn gây bệnh trong máu và dịch cơ thể là phương pháp nuôi cấy và xét nghiệm sinh hóa. Phương pháp này dựa vào việc nuôi cấy một mẫu bệnh phẩm trong môi trường giàu dinh dưỡng, sau đó nhận diện và kiểm tra tính miễn cảm của tác nhân gây bệnh sử dụng các xét nghiệm sinh hóa tiêu chuẩn. Cấy máu là một tiêu chuẩn vàng để phát hiện mầm bệnh trong nhiễm khuẩn bệnh viện, tuy nhiên phương pháp này tốn nhiều thời gian (thường từ 1 đến 5 ngày) tùy vào sinh vật gây bệnh, độ nhạy không cao gây ảnh hưởng đến quá trình trị liệu.

Để phát hiện sớm vi sinh vật gây nhiễm khuẩn trong cơ thể các nghiên cứu gần đây đã đưa ra những định hướng mới đó là phát hiện ADN đặc hiệu của vi khuẩn. Trong đó, phương pháp lai huỳnh quang tại chỗ (Fluorescent insitu hybridization: FISH) là một trong những kỹ thuật được nghiên cứu nhiều nhất. Phương pháp này sử dụng một đoạn dò gắn tín hiệu huỳnh quang, để phát hiện sự có mặt của đoạn gen đích đặc hiệu cho loài. FISH có thể xác định tới hơn 95% vi khuẩn và nấm men thường phát hiện trong mẫu máu nhiễm trùng chỉ sau từ 2,5 đến 3 giờ. Tuy nhiên, phương pháp này không thể phát hiện được một số vi khuẩn ở bậc phân loại chi vì không có đầu dò oligonucleotit đặc hiệu phù hợp.

Phương pháp phổ biến khác là phản ứng khuếch đại ADN (PCR- Polymerase chain reaction). Kỹ thuật này thường sử dụng phản ứng PCR đa môi hướng tới hệ gen của nhiều tác nhân gây bệnh khác nhau có khả năng lây nhiễm. Phương pháp này có độ nhạy cao, chính xác, phát hiện được nhiều tác nhân gây bệnh trong khoảng thời gian ngắn. Những phương pháp tiếp cận theo khía cạnh này bao gồm chuỗi các sản phẩm PCR từ các 16S rADN, nhân bản, điện di trên gel và giải trình tự. Những kỹ thuật như giải trình tự và giải trình tự thế hệ mới đòi hỏi thiết bị phức tạp, tốn kém và do đó không phải dễ dàng chuyển sang thực hành lâm sàng.

Trong số các loài vi khuẩn gây nhiễm khuẩn có những loài được cho là “chỉ thị” đối với việc lây nhiễm khuẩn. Việc xác định có mặt của một số loài này là có khả năng đánh giá được tình trạng lây nhiễm. Hiện việc đánh giá phải dựa trên việc kiểm soát từng đối tượng, ví dụ, để kiểm soát được 5 loài bao gồm *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* hiện vẫn phải sử dụng từ 3 đến 5 lần kiểm tra với các phương pháp hoặc các kit xét nghiệm khác nhau có được kết quả chính xác.

Đến nay, vẫn chưa có kit dựa trên việc phát hiện ADN mà cho phép phát hiện được đồng thời cả 5 nhóm vi khuẩn được gọi là “chỉ thị” trong việc nhiễm khuẩn tại các cơ sở y tế, đặc biệt là các bệnh viện, nơi cần kiểm soát việc lây nhiễm chéo cao. Do đó, cần có kit để chuẩn hóa việc xét nghiệm, cho phép phát hiện nhanh, chính xác với ngưỡng phát hiện thấp cho phép đánh giá, ngăn ngừa các nguy cơ lây nhiễm để có biện pháp xử lý thích hợp trước khi vấn đề lây nhiễm chéo trở nên nghiêm trọng. Theo đó, cần có kit có khả năng phát hiện được cả 5 loài vi khuẩn thường gặp *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* trong nhiễm khuẩn để kiểm soát dịch tễ cũng như kiểm soát sự lây nhiễm bệnh tại các cơ sở y tế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, theo đó sáng chế đề cập đến kit để xác định nhanh đồng thời cả năm nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng bao gồm *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* và *Staphylococcus aureus*, đoạn môi và đoạn dò dùng trong kit này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kit để xác định nhanh nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng bao gồm *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* và *Staphylococcus aureus*, trong đó kit này bao gồm các thành phần sau:

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Tổng (μl)
1	MX1	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	80
		Môi xuôi: SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.7, 10 pmol/μl mỗi loại	
		Môi ngược: SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.8, 10 pmol/μl mỗi loại	
		Mẫu dò: SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.9, 2 pmol/μl mỗi loại	
2	MX2	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	80
		Môi xuôi: SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.16, 10 pmol/μl mỗi loại	
		Môi ngược: SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.17, 10 pmol/μl mỗi loại	
		Mẫu dò: SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.18, 2 pmol/μl mỗi loại	
3	ĐC	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.19, plasmit chứa trình tự SEQ ID NO 20, plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.21, plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.22 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/μl	10

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kit này còn chứa 150 μl nước cất khử ion.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kit này còn bao gồm hướng dẫn sử dụng để thực hiện phản ứng realtime-PCR phát hiện đồng thời năm nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng thường gặp bao gồm *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* và *Staphylococcus aureus*.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến đoạn môi để xác định nhanh nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng dùng trong kit theo sáng chế, trong đó đoạn môi này bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 16 và SEQ ID NO. 17.

Theo một phương án ưu tiên, đoạn môi theo sáng chế để nhân các gen đích blaOxa-51-like, Citrate synthase (gltA), ADN gyrase subunit B (gyrB), YccT, Nuc và GAPDH.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến đoạn dò phát huỳnh quang để xác định nhanh nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng dùng trong kit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó đoạn dò này bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 15 và SEQ ID NO. 18.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là kết quả realtime-PCR khi sử dụng kit với MX1 và ĐC để xác định sự có mặt của *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* và gen GADPH.

Hình 2 là kết quả realtime-PCR khi sử dụng kit với MX2 và ĐC để xác định sự có mặt của *Staphylococcus aureus*, *E.coli* và *Pseudomonas aeruginosa*.

Hình 3 là kết quả realtime-PCR thực hiện đối với phức hợp MX1, MX2 và ĐC để xác định đồng thời cả 5 loài *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli* và *Pseudomonas aeruginosa* trong mẫu thử nghiệm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện và các ví dụ cụ thể. Tuy nhiên, các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể này chỉ nhằm minh họa để hiểu rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Sáng chế đề cập đến kit để xác định nhanh đồng thời cả năm nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng bao gồm *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* và *Staphylococcus aureus*, đoạn môi và đoạn dò dùng trong kit này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kit để xác định nhanh nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng bao gồm *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* và *Staphylococcus aureus*, trong đó kit này bao gồm các thành phần sau:

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Tổng (µl)
1	MX1	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	80
		Mồi xuôi: SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.7, 10 pmol/µl mỗi loại	
		Mồi ngược: SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.8, 10 pmol/µl mỗi loại	
		Mẫu dò: SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.9, 2 pmol/µl mỗi loại	
2	MX2	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	80
		Mồi xuôi: SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.16, 10 pmol/µl mỗi loại	
		Mồi ngược: SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.17, 10 pmol/µl mỗi loại	
		Mẫu dò: SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.18, 2 pmol/µl mỗi loại	
3	ĐC	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.19, plasmit chứa trình tự SEQ ID NO 20, plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.21, plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.22 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/µl	10

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kit này còn chứa 150 µl nước cất khử ion. Trong đó các gen đích được xác định bao gồm gen ^{bla}Oxa-51-like của chủng vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae*, gen Citrate synthase (gtlA) của chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, ADN gyrase subunit B (gyrB) của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*, YccT của chủng vi khuẩn *Acintobacter baumannii*, Nuc của chủng vi khuẩn *Escherichia coli* và GAPDH được sử dụng làm đối chứng.

Các đoạn dò đặc hiệu được gắn các đầu dò huỳnh quang FAM cho màu xanh lá (green), HEX cho màu cam (orange) và Cy5 cho màu xanh lam tương ứng theo hướng dẫn của nhà cung cấp huỳnh quang. Các gen đích, trình tự mồi, đoạn dò tương ứng được tổng hợp trong bảng sau:

Gen đích	SEQ ID NO	Trình tự (5'-3')
^{bla} Oxa-51-like	1	GAAGTGAAGCGTGTGGTTAT
	2	GCCTCTTGCTGAGGAGTAAT
	3	HEX-CGACTTGGG-ZEN-TACCGATATCTGCATTGC-3IABkFQ

Citrate synthase (gtlA)	4	CCAGTTAGCGACCGAATCTAAT
	5	CGGGTGATCTGCTCATGAAT
	6	56FAM-CGACCCAG-ZEN-CCGAATATGACGAAT-3IABkFQ
ADN gyrase subunit B (gyrB)	7	CACCCTGCTGTTGACCTTCTT
	8	CTGGTCGTCCTTGATGTACTG
	9	5Cy5-CCCACATGG-TAO-CCTCCAAGGAGTAAG-3IABkRQSp
YccT	10	CCAATTCCGGTAAAGCTGGATA
	11	GCGTTTCGCGGATTTGTTATAG
	12	5HEX-TCTCGCCATTACCTCAACGGCAAA-3IABkfQ
Nuc	13	AGGGATGGCTATCAGTAATGTTT
	14	CGCCGTTATCTGTTTGTGATG
	15	6-FAM-CGAAAGGGC-ZEN-AATACGCAAAGAGGT-3IABkFQ
Gen GAPDH	16	AGGGTGGTGGACCTCAT
	17	CTCTCTTCCTCTTGCTCTTG
	18	5Cy5-CCCACATGG-TAO-CCTCCAAGGAGTAAG-3IABkRQSp

Theo đó, kit theo sáng chế cho phép phát hiện đồng thời 5 gen đặc hiệu tương ứng với 5 chủng vi khuẩn tương ứng, trong đó gen ^{bla}Oxa-51-like của chủng vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae*, gen Citrate synthase (gtlA) của chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, ADN gyrase subunit B (gyrB) của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*, YccT của chủng vi khuẩn *Acinetobacter baumannii*, Nuc của chủng vi khuẩn *Escherichia coli*. Ngoài ra, gen GAPDH được sử dụng làm đối chứng nội cho phép xác định khả năng nhân lên của mẫu trong quá trình PCR.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kit này còn bao gồm hướng dẫn sử dụng để thực hiện phản ứng realtime-PCR phát hiện đồng thời năm nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng thường gặp bao gồm *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* và *Staphylococcus aureus*.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến đoạn mô tả để xác định nhanh nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng dùng trong kit theo sáng chế, trong đó đoạn mô tả này bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 16 và SEQ ID NO. 17.

Theo một phương án ưu tiên, đoạn mồi theo sáng chế để nhân các gen đích *bla*Oxa-51-like, Citrate synthase (gtlA), ADN gyrase subunit B (gyrB), YccT, Nuc và GAPDH.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến đoạn dò phát huỳnh quang để xác định nhanh nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng dùng trong kit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó đoạn dò này bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 15 và SEQ ID NO. 18.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.19 của gen đích *bla*Oxa-51-like của chủng vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae*, plasmid chứa trình tự SEQ ID NO 20 của gen đích gen Citrate synthase (gtlA) của chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.21 của gen đích ADN gyrase subunit B (gyrB) của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*, plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.22 của gen đích YccT của chủng vi khuẩn *Acinetobacter baumannii*, và plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.23 của gen đích Nuc của chủng vi khuẩn *Escherichia coli* làm đối chứng dương. Các plasmid này có trong kit được định lượng theo tỷ lệ 1:1 với nồng độ khoảng 5×10^3 plasmid/ μ l để làm đối chứng dương.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất kit để xác định nhanh nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng

Để sản xuất kit để xác định nhanh nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng theo sáng chế, thực hiện tổng hợp 12 đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 riêng rẽ bằng phương pháp tổng hợp hóa học chuẩn. Dung dịch đệm 2X, các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza là các hóa chất chuẩn có thể mua được trên thị trường hoặc pha theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các đoạn dò đánh dấu huỳnh quang được đánh dấu theo phương pháp chuẩn dựa trên mẫu dò ban đầu.

Mẫu DC bao gồm các plasmid chứa trình tự gen đích nêu trong SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23 và SEQ ID NO. 24 được tạo ra bằng phương pháp sau:

Tạo plasmid chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.19 làm mẫu đối chứng

Tách dòng đoạn gen KpCyt của chủng vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* bằng các đoạn mỗi sau:

KpCyt xuôi: CCAGTTAGCGACCGAATCTAAT

KpCyt ngược: CGGGTGATCTGCTCATGAAT

Sau đó trình tự gen đích KpCyt có trình tự nêu trong SEQ ID NO.19 được chuyển vào vector tách dòng và tái tổ hợp trong vi khuẩn *E.coli* trong vector tách dòng pCR2.1–TOPO (Invitrogen). Sau khi chọn lọc, nhân chủng *E.coli* tái tổ hợp, chiết thu plasmit, chuẩn độ đến nồng độ khoảng 5×10^3 plasmit/ μ l để làm mẫu đối chứng dương.

Tạo plasmit chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.20 làm mẫu đối chứng

Tách dòng đoạn gen SaNuc của chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* bằng các đoạn mỗi sau:

SaNuc xuôi: AGGGATGGCTATCAGTAATGTTT

SaNuc ngược: CGCCGTTATCTGTTTGTGATG

Sau đó trình tự gen đích SaNuc có trình tự nêu trong SEQ ID NO.20 được chuyển vào vector tách dòng và tái tổ hợp trong vi khuẩn *E.coli* trong vector tách dòng pBT (Invitrogen). Sau khi chọn lọc, nhân chủng *E.coli* tái tổ hợp, chiết thu plasmit, chuẩn độ đến nồng độ khoảng 5×10^3 plasmit/ μ l để làm mẫu đối chứng dương.

Tạo plasmit chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.21 làm mẫu đối chứng

Tách dòng đoạn gen PaGyr của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* bằng các đoạn mỗi sau:

PaGyr xuôi: CACCCTGCTGTTGACCTTCTT

PaGyr ngược: CTGGTCGTCCTTGATGTACTG

Sau đó trình tự gen đích PaGyr có trình tự nêu trong SEQ ID NO.21 được chuyển vào vector tách dòng và tái tổ hợp trong vi khuẩn *E.coli* trong vector tách dòng pBT (Invitrogen). Sau khi chọn lọc, nhân chủng *E.coli* tái tổ hợp, chiết thu plasmit, chuẩn độ đến nồng độ khoảng 5×10^3 plasmit/ μ l để làm mẫu đối chứng dương.

Tạo plasmit chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.22 làm mẫu đối chứng

Tách dòng đoạn gen AcOxa của chủng vi khuẩn *Acintobacter baumannii* bằng các đoạn mỗi sau:

AcOxa xuôi: GAAGTGAAGCGTGTGTTAT

AcOxa ngược: GCCTCTTGCTGAGGAGTAAT

Sau đó trình tự gen đích AcOxa có trình tự nêu trong SEQ ID NO.22 được chuyển vào vector tách dòng và tái tổ hợp trong vi khuẩn *E.coli* trong vector tách dòng pCR2.1–TOPO (Invitrogen). Sau khi chọn lọc, nhân chủng *E.coli* tái tổ hợp, chiết thu plasmit, chuẩn độ đến nồng độ khoảng 5×10^3 plasmit/ μ l để làm mẫu đối chứng dương.

Tạo plasmit chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.23 làm mẫu đối chứng

Tách dòng đoạn gen EcYcc của chủng vi khuẩn *Escherichia coli* bằng các đoạn mỗi sau:

EcYcc_xuôi: CCAATTCCGGTAAAGCTGGATA

EcYcc ngược: GCGTTTCGCGGATTTGTTATAG

Sau đó trình tự gen đích EcYcc có trình tự nêu trong SEQ ID NO.22 được chuyển vào vector tách dòng và tái tổ hợp trong vi khuẩn *E.coli* trong vector tách dòng pCR2.1–TOPO (Invitrogen). Sau khi chọn lọc, nhân chủng *E.coli* tái tổ hợp, chiết thu plasmit, chuẩn độ đến nồng độ khoảng 5×10^3 plasmit/ μ l để làm mẫu đối chứng dương.

Tạo plasmit chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.24 làm mẫu đối chứng

Tách dòng đoạn gen *GADPH* bằng các đoạn mỗi sau:

GADPH_xuôi: AGGGTGGTGGACCTCAT

GADPH ngược: CTCTCTTCCTCTTGTGCTCTTG

Sau đó trình tự gen đích EcYcc có trình tự nêu trong SEQ ID NO.22 được chuyển vào vector tách dòng và tái tổ hợp trong vi khuẩn *E.coli* trong vector tách dòng pCR2.1–TOPO (Invitrogen). Sau khi chọn lọc, nhân chủng *E.coli* tái tổ hợp, chiết thu plasmit, chuẩn độ đến nồng độ khoảng 5×10^3 plasmit/ μ l để làm mẫu đối chứng dương.

Tạo kit với các thành phần như sau:

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Tổng (μ l)
1	MX1	Dung dịch đậm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	80
		Mỗi xuôi: SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.7, 10 pmol/ μ l mỗi loại	
		Mỗi ngược: SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.8,	

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Tổng (μl)
2	MX2	10 pmol/μl mỗi loại	80
		Mẫu dò: SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.9, 2 pmol/μl mỗi loại	
		Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	
		Môi xuôi: SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.16, 10 pmol/μl mỗi loại	
3	ĐC	Môi ngược: SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.17, 10 pmol/μl mỗi loại	10
		Mẫu dò: SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.18, 2 pmol/μl mỗi loại	
		Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.19, plasmit chứa trình tự SEQ ID NO 20, plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.21, plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.22 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/μl	

Kit được đóng gói, gắn nhãn và được bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi được sử dụng.

Ví dụ 2. Thử nghiệm xác định độ nhạy, tính đặc hiệu của kit

Độ nhạy, độ đặc hiệu của chủng chuẩn được tiến hành trên 97 mẫu có kết quả nuôi cấy dương tính phù hợp với 5 loại vi khuẩn nghiên cứu và 30 mẫu âm tính sau 7 ngày nuôi cấy. 97 mẫu chuẩn được tách chiết ADN tổng số, tiến hành phản ứng realtime PCR, cho thấy tất cả các mẫu ADN của vi khuẩn đích đều được phát hiện. Do đó, độ nhạy của kit theo sáng chế dựa trên các mẫu ADN của các chủng chuẩn đạt 100%. Đối với các mẫu âm tính (30 mẫu) cũng được tách ADN tổng số, xác định âm tính bằng kit PCR đa môi. Kết quả cho thấy các mẫu âm tính đều không phát hiện được hoặc có giá trị $C_t > 35$. Do đó dựa trên 30 mẫu âm tính, độ đặc hiệu của kit được tính là 100%. Cuối cùng, xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ kit trên 143 mẫu bệnh phẩm, từ kết quả thu được, xác định được độ nhạy của kit đạt 97,6%; độ đặc hiệu của kit đạt 92,4%.

Kết quả xác định đối với kit khi sử dụng MX1 và ĐC riêng rẽ đối với mẫu bệnh phẩm (mẫu đờm 12) cho kết quả trên Hình 1. Trong đó cho thấy bệnh nhân dương tính với Ac (*Acinetobacter baumannii*) với đường Hex 21,62, đối chứng dương với ba đường Fam đạt 12,68, Hex 12,81 và Cy5 là 11,07 tương ứng.

Kết quả xác định đối với kit khi sử dụng MX1 và ĐC riêng rẽ đối với mẫu bệnh phẩm (mẫu NT2) cho kết quả trên Hình 2. Kết quả cho thấy bệnh nhân dương tính với Ec (*E.coli*) và Pa (*Pseudomonas aeruginosa*) như trong bảng sau:

1	Bệnh nhân (+) Ec	Hex	15,71
2	Bệnh nhân (+) Pa	Cy5	21,47
3	Đối chứng dương	Fam	14,88
4		Hex	13,02
5		Cy5	10,15

Kết quả xác định đối với kit khi sử dụng cả MX1, MX2 và ĐC trên mẫu thử nghiệm cho 5 mẫu dương đồng thời cho kết quả trên Hình 3. Trong đó cho thấy kit có khả năng phát hiện được đồng thời cả 5 loại vi khuẩn tương ứng như trong bảng sau:

STT	Mẫu	Kênh màu	Ct
1	Sa, Ec, Pa	Fam Sa	14,20
2		Hex Ec	15,40
3		Cy5 Pa	20,85
4	Kp, Ac	Fam Kp	13,72
5		Hex Ac	13,78
6	Đối chứng dương	Fam Kp	14,20
7		Hex Ac	18,60
8		Cy5 Ga	22,24
9	Đối chứng dương	Fam Sa	14,06
10		Hex Ec	15,73
11		Cy5 Pa	21,70

Như vậy có thể thấy rằng, kit theo sáng chế có khả năng phát hiện đồng thời cả 5 chủng vi khuẩn gây nhiễm trùng bao gồm *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* và *Staphylococcus aureus* hoặc có thể phát hiện được từng chủng tùy theo yêu cầu với độ đặc hiệu và độ nhạy cao, thích hợp sử dụng để kiểm soát lây nhiễm, kiểm tra sự có mặt của vi khuẩn cũng như ứng dụng trong chẩn đoán nhanh sự có mặt của vi khuẩn trong mẫu.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kit để xác định nhanh nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng bao gồm *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* và *Staphylococcus aureus*, trong đó kit này bao gồm các thành phần sau:

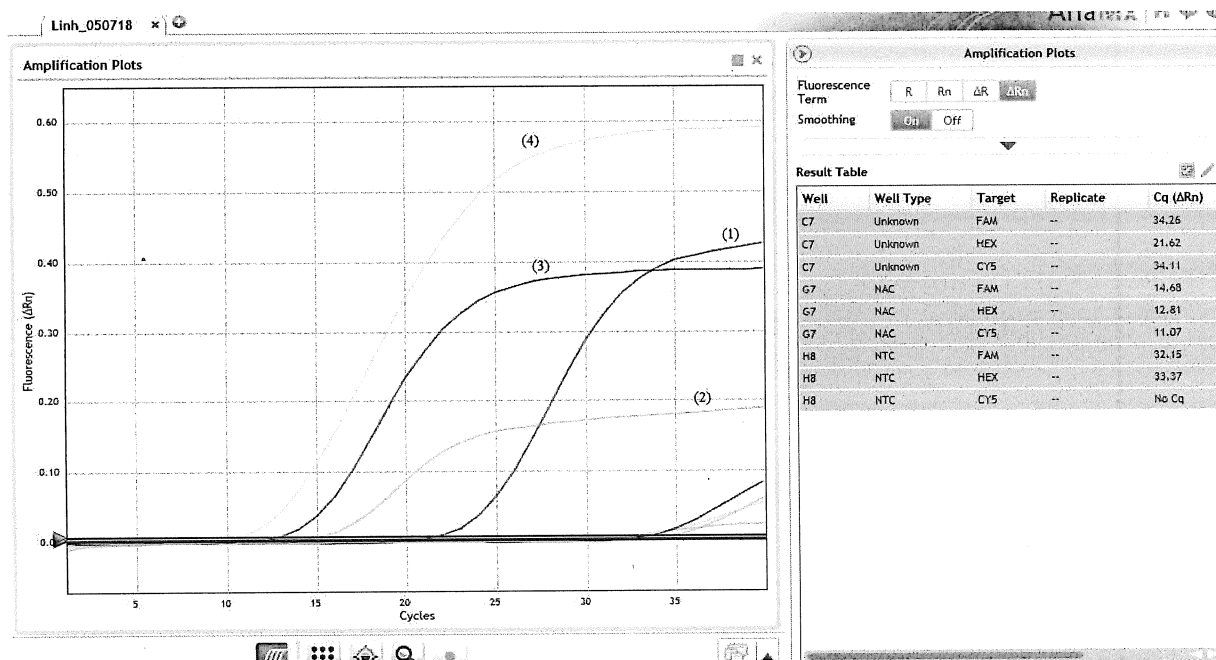
stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Tổng (µl)
1	MX1	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	80
		Mồi xuôi: SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.7, 10 pmol/µl mỗi loại	
		Mồi ngược: SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.8, 10 pmol/µl mỗi loại	
		Mẫu dò: SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.9, 2 pmol/µl mỗi loại	
2	MX2	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	80
		Mồi xuôi: SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.16, 10 pmol/µl mỗi loại	
		Mồi ngược: SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.17, 10 pmol/µl mỗi loại	
		Mẫu dò: SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.18, 2 pmol/µl mỗi loại	
3	ĐC	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.19, plasmit chứa trình tự SEQ ID NO 20, plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.21, plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.22 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/µl	10

2. Kit theo điểm 1, trong đó kit này còn chứa 150 µl nước cất khử ion.

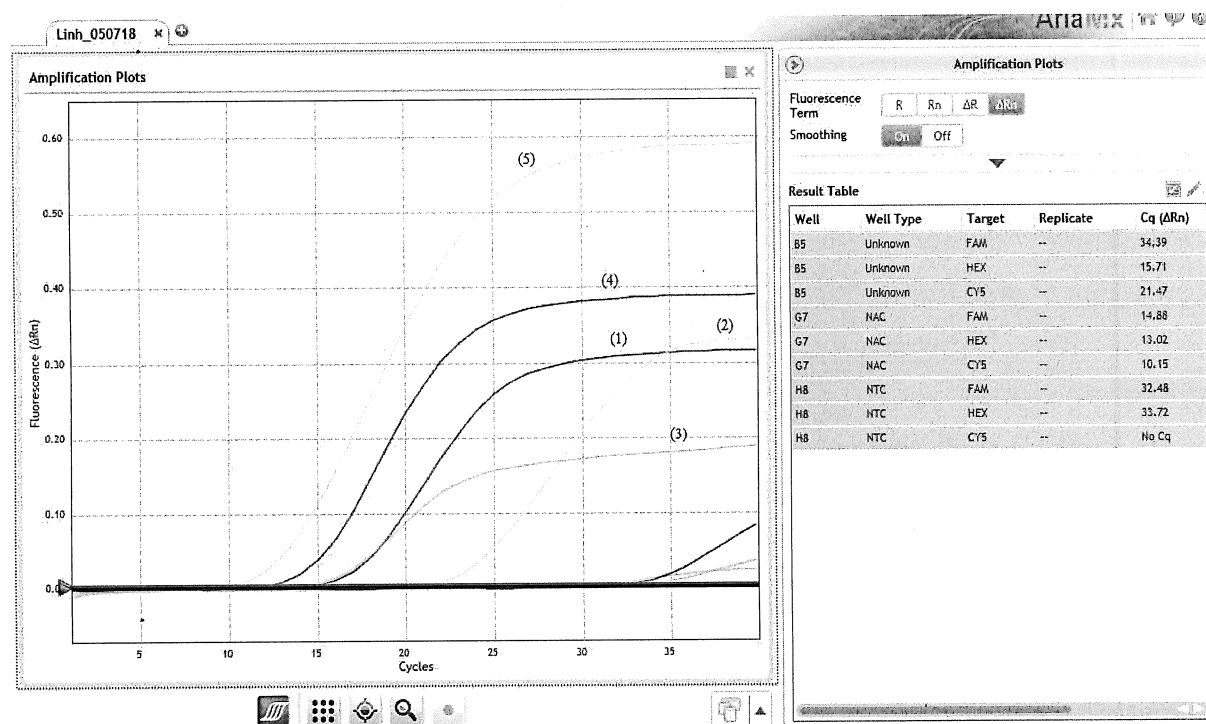
3. Đoạn mồi để xác định nhanh nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng dùng trong kit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó đoạn mồi này bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 16 và SEQ ID NO. 17.

4. Đoạn dò phát huỳnh quang để xác định nhanh nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng dùng trong kit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó đoạn dò này bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 15 và SEQ ID NO. 18.

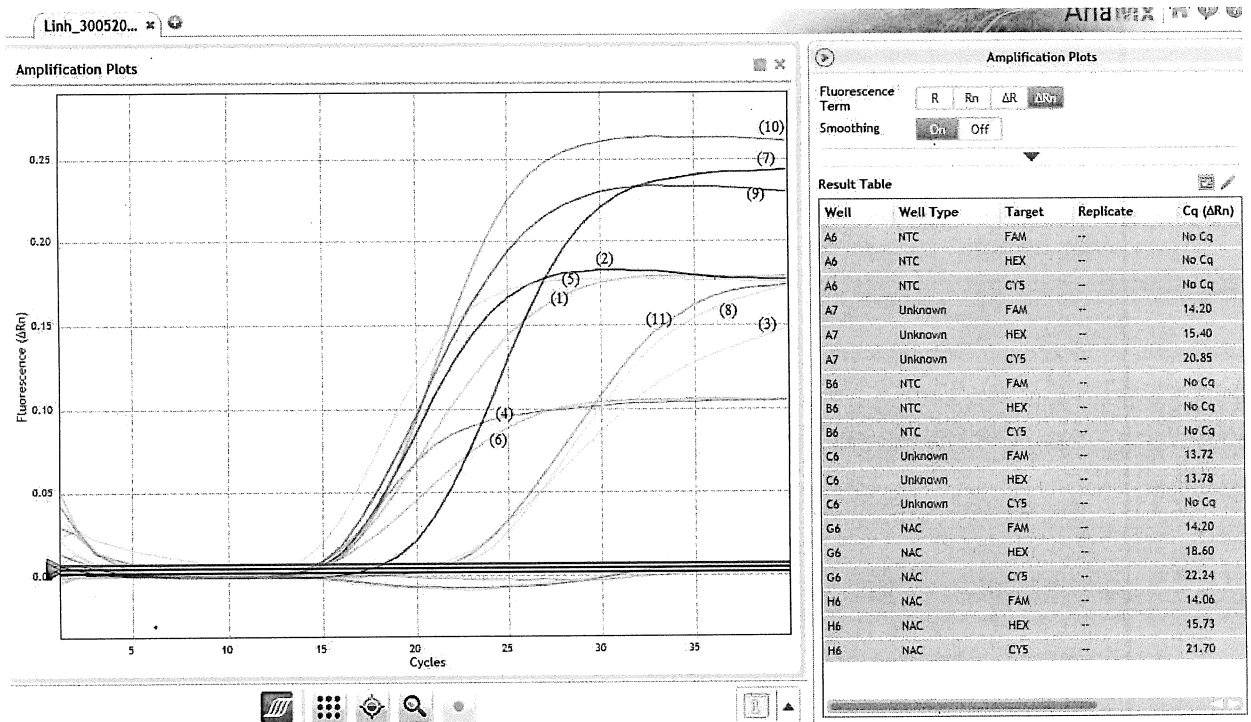
HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Lã Thị Huyền
 <120> Kit để xác định nhanh nhóm vi khuẩn gây nhiễm trùng, cặp mỗi và
 đoạn dò dùng trong kit này

<130>

<160> 24

<170>

<210> 1

<211> 21

<212> ADN .

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<222>

<223>

<400> 1

GAAGTGAAGCGTGTGGTTAT

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<222>

<223>

<400> 2

GCCTCTTGCTGAGGAGTAAT

<210> 3

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò gắn dấu huỳnh quang

<220>

<222>

<223>

<400> 3

5HEX-CGACTTGGG-ZEN-TACCGATATCTGCATTGC-3IABkFQ

<210> 4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <222>
 <223>
 <400> 4
 CCAGTTAGCGACCGAATCTAAT

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <222>
 <223>

<400> 5
 CGGGTGATCTGCTCATGAAT

<210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Đoạn dò
 <220>
 <223> Gen lục lạp

<220>
 <222>
 <223>

<400> 6
 56-FAM-CGACCCAG-ZEN-CCGAATATGACGAAT-3IABkFQ

<210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>

<222>

<223>

<400> 7

CTGGTCGTCCTTGATGTACTG

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<222>

<223>

<400> 8

CTGGTCGTCCTTGATGTACTG

<210> 9

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò gắn dấu huỳnh quang

<220>

<222>

<223>

<400> 9

5Cy5-CCCACATGG-TAO-CCTCCAAGGAGTAAG-3IABkRQSp

<210> 10

<211> 22

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<222>

<223>

<400> 10

CCAATTCCGGTAAAGCTGGATA

<210> 11

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <222>
 <223>

<400> 11
 GCGTTTCGCGGATTTGTTATAG

<210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn dò gắn dấu huỳnh quang

<220>
 <222>
 <223>

<400> 12
 5HEX-TCTCGCCATTACCTCAACGGCAAA-3IABkfQ

<210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <222>
 <223>

<400> 13
 AGGGATGGCTATCAGTAATGTTT

<210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <222>

<223>

<400> 14
CGCCGTTATCTGTTTGTGATG

<210> 15
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò gắn dấu huỳnh quang

<220>
<222>
<223>

<400> 15
FAM-CGAAAGGGC-ZEN-AATACGCAAAGAGGT-3IABkFQ

<210> 16
<211> 17
<212> ADN
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<222>
<223>

<400> 16
AGGGTGGTGGACCTCAT

<210> 17
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<222>
<223>

<400> 17
CTCTCTTCCTCTTGTGCTCTTG

<210> 18

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn dò gắn dấu huỳnh quang

<220>
 <222>
 <223>

<400> 18
 5Cy5-CCCACATGG-TAO-CCTCCAAGGAGTAAG-3IABkRQSp

<210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Plasmid
 <220>
 <223> Cyt của chủng *Klebsiella pneumoniae*

<220>
 <222>
 <223>

<400> 19
 CCAGTTAGCG ACCGAATCTA ATTATCTTGA AGTCTGTTAT ATCCTGCTGT ACGGCGAAAA 60
 GCCGACCCAG GCCGAATATG ACGAATTCAA AACTACCGTC ACCCGCCACA CCATGATTCA 120
 TGAGCAGATC ACCCG 135

<210> 20
 <211> 140
 <212> ADN
 <213> Plasmid
 <220>
 <223> Nuc của vi khuẩn *Staphylococcus aureus*

<220>
 <222>
 <223>

<400> 20
 AGGGATGGCT ATCAGTAATG TTTCGAAAGG GCAATACGCA AAGAGGTTTT TCTTTTTTCGC 60
 TACTAGTTGC TTAGTGTTAA CTTTAGTTGT AGTTTCAAGT CTAAGTAGCT CAGCAAATGC 120
 ATCACAAACA GATAACGGCG 140

<210> 21
 <211> 127

<212> ADN
 <213> Plasmit
 <220>
 <223> Gyr của vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*

<220>
 <222>
 <223>

<400> 21
 CCTGCTGTTG ACCTTCTTCT TCCGCCAGAT GCCCGAGCTG ATCGAGCGTG GCTACATCTA 60
 CATCGCCCAG CCCCCGTTGT ACAAGGTCAA GCGCGGCAAG CAGGAGCAGT ACATCAAGGA 120
 CGACCAG 127

<210> 22
 <211> 98
 <212> ADN
 <213> Plasmit
 <220>
 <223> Oxa của chủng *Acintobacter baumannii*

<220>
 <222>
 <223>

<400> 22
 GAAGTGAAGC GTGTTGGTTA TGGCAATGCA GATATCGGTA CCCAAGTCGA TAATTTTGG 60
 CTGGTAGGTC CTTTAAAAAT TACTCCTCAG CAAGAGGC 98

<210> 23
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> Plasmit
 <220>
 <223> Ycc của *E.coli*

<220>
 <222>
 <223>

<400> 23
 CCAATTCCGG TAAAGCTGGA TATTCTCGCC ATTACCTCAA CGGCAAAAAC GATTGATTAT 60
 GAGGTCGAGG TTGAACGCTA TAACAAATCC GCGAAACGC 99

<210> 24
 <211> 87

<212> ADN

<213> Tổng hợp

<220>

<223> gen GADPH tổng hợp

<220>

<222>

<223>

<400> 24

AGGGTGGTGG ACCTCATGGC CCACATGGCC TCCAAGGAGT AAGACCCCTG GACCACCAGC

60

CCCAGCAAGA GCACAAGAGG AAGAGAG

87