

## NGHIÊN CỨU THIẾT LẬP QUY TRÌNH TẠO BỘ SINH PHẨM IN-HOUSE LEPTO-LAT TRONG SÀNG LỌC PHÁT HIỆN NHIỄM *LEPTOSPIRA*

Lê Thị Lan Anh<sup>1,✉</sup>, Vũ Thị Thương<sup>1</sup>, Phạm Thị Hà Giang<sup>1</sup>, Bùi Thị Thanh Nga<sup>1</sup>, Minh Thị Hằng<sup>2</sup>, Triệu Phi Long<sup>3</sup>, Đào Thị Hà Thanh<sup>4</sup>, Lê Thị Vân Anh<sup>5,6</sup>, Nguyễn Hữu Đức<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga

<sup>2</sup>Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Y học dự phòng Quân đội

<sup>4</sup>Viện Thú y Trung Ương

<sup>5</sup>Tạp chí Công nghệ Sinh học, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>6</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: leanhbio@gmail.com

Ngày nhận bài: 01.11.2020

Ngày nhận đăng: 30.01.2021

### TÓM TẮT

*Leptospirosis* là bệnh truyền từ động vật sang người phổ biến ở các vùng khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới. Người nhiễm *Leptospira* không được điều trị sẽ dẫn đến thoái hóa nặng kèm theo tổn thương thận và/hoặc gan cũng như xuất huyết phổi nặng dẫn đến tử vong. Bên cạnh phương pháp chuẩn vàng MAT, sử dụng các kháng nguyên của *Leptospira* bằng công nghệ DNA tái tổ hợp đã và đang được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trong chẩn đoán nhiễm *Leptospira* trên người và động vật. Khắc phục được nhược điểm của MAT và ELISA như quy trình phức tạp, đòi hỏi cán bộ có chuyên môn cao và trang thiết bị chuyên dụng đi kèm, phương pháp ngưng kết hạt latex đã được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi trên thế giới trong phát hiện các tác nhân gây bệnh như *Salmonella*, *E. coli*, *Leptospira*. Ưu điểm của phương pháp này là độ nhạy, độ đặc hiệu cao, thao tác đơn giản, nhanh chóng và rẻ tiền, có thể áp dụng được tại các cơ sở y tế của địa phương. Trong nghiên cứu trước, kháng nguyên LigB của *Leptospira* đã được biểu hiện trong tế bào *E. coli* và tinh sạch thành công bằng sắc ký ái lực với độ sạch trên 98%. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày quy trình tạo kit Lepto-LAT để phát hiện nhiễm *Leptospira* trên chó nghi nhiễm *Leptospira*. Kết quả thử nghiệm cho thấy kit này có độ nhạy và độ đặc hiệu cao lần lượt là 91,75% và 91,57%, tương đương hoặc cao hơn các nghiên cứu trên thế giới.

**Từ khóa:** *Leptospira*, MAT, ngưng kết hạt latex, độ nhạy, độ đặc hiệu

### ĐẶT VẤN ĐỀ

*Leptospirosis* là bệnh nhiễm khuẩn cấp tính xuất hiện chủ yếu ở vùng khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới với tác nhân gây bệnh là xoắn khuẩn *Leptospira* spp. Theo Tổ chức y tế thế giới (WHO) năm 2011, *Leptospirosis* được xếp thứ 10 trong 15 bệnh truyền nhiễm nguy hiểm trên toàn cầu. Kết quả khảo sát tình hình nhiễm

*Leptospira* cho thấy hàng năm trên thế giới có khoảng 1 triệu trường hợp nhiễm *Leptospira* và khoảng 60.000 trường hợp tử vong do *Leptospira* (Costa *et al.*, 2015). Do đó, bên cạnh các nghiên cứu khảo sát dịch tễ học *Leptospirosis* thì các nghiên cứu chẩn đoán phát hiện nhiễm *Leptospira* đã và đang được nhiều nghiên cứu trên thế giới quan tâm.

Trong chẩn đoán nhiễm *Leptospira*, kỹ thuật

Microscopic agglutination test (MAT) được xem là tiêu chuẩn vàng và được áp dụng rộng rãi tại các viện nghiên cứu. Tuy nhiên, với quy trình thực hiện phức tạp, thời gian cho kết quả lâu, cần các trang thiết bị chuyên dụng và cán bộ có trình độ chuyên môn sâu do đó khó áp dụng vào thực tế. Vì vậy, các nghiên cứu lựa chọn phương pháp chẩn đoán nhiễm *Leptospira* có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, có thể thay thế MAT và áp dụng được tại các bệnh viện hay cơ sở y tế đã và đang được nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm. Hiện nay, cùng với sự phát triển của công nghệ DNA tái tổ hợp, sản xuất các kháng nguyên tái tổ hợp của *Leptospira* trong chẩn đoán *Leptospira* bằng ELISA đã được báo cáo. Kết quả cho thấy các bộ kit ELISA sử dụng các kháng nguyên rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 (Qiu *et al.*, 2008), LipL41 (Ambily *et al.*, 2019) và LigA, LigB (Nagalingam *et al.*, 2015; Shekatkar *et al.*, 2010) có thể áp dụng trong phát hiện *Leptospira* ở giai đoạn sớm. Trong các kháng nguyên của *Leptospira*, sử dụng LigA và LigB làm nguyên liệu chế tạo bộ kit ELISA có độ nhạy và độ đặc hiệu cao và đây được xem là nguồn vaccine tiềm năng cho phòng bệnh *Leptospirosis* trên người cũng như được đánh giá là marker cho chẩn đoán nhiễm *Leptospira* ở giai đoạn cấp (Croda *et al.*, 2007; Palaniappan *et al.*, 2004). Tại Ấn Độ, bộ kit IgM-ELISA sử dụng LigB làm nguyên liệu trong chẩn đoán nhiễm khuẩn *Leptospira* trên bò có độ nhạy và độ đặc hiệu so với MAT lần lượt là 96,9% và 91,08% (Shekatkar *et al.*, 2010).

Hiện nay, việc chẩn đoán *Leptospira* tại Việt Nam, đặc biệt là trong chăn nuôi, còn gặp nhiều khó khăn do thiếu hụt về sinh phẩm chẩn đoán và năng lực xét nghiệm. Do đó, các nghiên cứu chế tạo bộ sinh phẩm chẩn đoán nhanh *Leptospira* đã và đang được quan tâm. Với mục đích chế tạo bộ sinh phẩm chẩn đoán nhanh *Leptospira*, trong bài báo trước chúng tôi đã chế tạo và tinh sạch thành công kháng nguyên LigB tái tổ hợp của *Leptospira* làm nguyên liệu chế tạo bộ sinh phẩm Lepto-LAT (Lê Thị Lan Anh *et al.*, 2019). Đây là kháng nguyên được chứng minh là có mặt ở hầu hết các *Leptospira* gây bệnh mà không có ở *Leptospira* không gây bệnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu thiết

lập quy trình chế tạo bộ sinh phẩm Lepto-LAT (Leptospirosis Latex Agglutination Test) dùng trong sàng lọc phát hiện nhiễm xoắn khuẩn *Leptospira*.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Mẫu nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu gồm 192 mẫu huyết thanh lợn, bò thu thập tại các huyện Đông Anh, Chương Mỹ thuộc thành phố Hà Nội; các huyện Yên Lạc, Vĩnh Phúc và Kỳ Sơn thuộc tỉnh Hòa Bình. Các mẫu huyết thanh được thu thập trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu cấp Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga: “Nghiên cứu quy trình tạo bộ sinh phẩm Lepto-LAT (Leptospirosis Latex Agglutination Test) phát hiện nhiễm *Leptospira*”.

### Kháng nguyên

Protein LigB tái tổ hợp độ sạch trên 98%, đã thẩm tích loại muối (300 µg/mL).

Bộ kháng nguyên chuẩn gồm 15 serovar của *Leptospira* (do Viện Y học Dự phòng Quân đội cung cấp) được liệt kê trong bảng 1.

### Phương pháp MAT chẩn đoán nhiễm *Leptospira*

Vi khuẩn *Leptospira* được nuôi cấy ở môi trường lỏng EMJH (Difco, Mỹ) ở 29°C trong khoảng 4 - 8 ngày để đạt mật độ là  $2 \times 10^8$  CFU. Huyết thanh được pha loãng ở nồng độ 1/50. Sử dụng 15 chủng *Leptospira* chuẩn để xác định khả năng ngưng kết với huyết thanh kiểm tra bằng cách nhỏ từng kháng nguyên với lượng tương đương với lượng huyết thanh cần chẩn đoán để lượng huyết thanh pha loãng cuối cùng là 1/100. Lắc đều và ủ đĩa ở tủ ấm 29°C trong khoảng thời gian 1,5 - 4 h. Đọc kết quả dưới kính hiển vi nền đen. Phản ứng được đánh giá là dương tính nếu như tại độ pha loãng 1/100 quan sát thấy 50% vi khuẩn ngưng kết, 50% vi khuẩn tự do. Nếu vi khuẩn ngưng kết trên 50% thì tiếp tục pha loãng với các hiệu giá 1/200; 1/400... Ở nồng độ huyết thanh pha loãng nào vẫn gây ngưng kết 50% vi khuẩn thì kết luận mẫu huyết

thanh kiểm tra dương tính ở hiệu giá đó. Phản ứng âm tính là phản ứng mà tại đó *Leptospira* vẫn hoạt động bình thường, có cụm ngưng kết nhỏ hơn 50% *Leptospira* ngưng

kết. Mẫu đối chứng âm dùng dung dịch muối đệm phosphate thay cho huyết thanh, một mẫu đối chứng dương dùng kháng huyết thanh chuẩn.

**Bảng 1.** Bộ kháng nguyên *Leptospira* dùng trong nghiên cứu.

TT	Serogroup	Serovar	Chủng
1	<i>Australis</i>	<i>Australis</i>	Ballico
2	<i>Autumnalis</i>	<i>Autumnalis</i>	AkiyamiA
3	<i>Bataviae</i>	<i>Bataviae</i>	Van Tienen
4	<i>Bratislava</i>	<i>Bratislava</i>	Bratislava
5	<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	Hond Utrecht IV
6	<i>Gryppotyphosa</i>	<i>Gryppotyphosa</i>	Moskva V
7	<i>Hebdomadis</i>	<i>Hebdomadis</i>	Hebdomadis
8	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	Verdun
9	<i>Javanica</i>	<i>Javanica</i>	Veldrat Bataviae 46
10	<i>Panama</i>	<i>Panama</i>	CZ 214K
11	<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Pomona
12	<i>Pyrogenes</i>	<i>Pyrogenes</i>	Salinem
13	<i>Sejroe</i>	<i>Hardjo</i>	bovis
14	<i>Sejroe</i>	<i>Saxkoebing</i>	saxkoebing
15	<i>Tarassovi</i>	<i>Taramitis</i>	Taramitis

**Gắn kháng nguyên rligB lên hạt latex**

Quy trình gắn kháng nguyên rligB lên hạt latex được thực hiện dựa theo mô tả của Behera và đồng tác giả (2016) với một số cải biến (Behera *et al.*, 2016). Dùng pipet hút 1 lượng dung dịch hạt latex (đường kính 0,8 µm, Sigma, Mỹ), li tâm 8000 vòng/phút trong 3 phút ở nhiệt độ phòng, loại dịch nổi. Cặn/tủa được hoà lại trong 1 mL dung dịch đệm 0,06 M carbonate-bicarbonate, pH9,6, li tâm 8000 vòng/phút trong 3 phút ở nhiệt độ phòng, loại dịch nổi. Tủa tiếp tục được rửa trong 1 mL dung dịch đệm 0,06 M carbonate-bicarbonate, pH 9,6, li tâm 8000 vòng/phút trong 3 phút ở nhiệt độ phòng, loại dịch nổi. Phần tủa chứa hạt latex được bổ sung dung dịch đệm 0,06M carbonate-bicarbonate, pH 9,6 và dung dịch rLigB (100 µg/mL) theo tỷ lệ 1:1, trộn đều và ủ ở 37°C, lắc nhẹ với tốc độ 150 vòng/phút trong 6 giờ. Li tâm ở 8000 vòng/phút trong 3 phút ở nhiệt độ phòng, loại dịch nổi. Tủa chứa hạt latex và protein được bổ

sung dung dịch đệm chứa PBS 50 mM, pH 7,4 và 5 mg/mL BSA. Lắc dung dịch qua đêm ở 37°C, 150 vòng/phút. Li tâm ở 8000 vòng/phút trong 3 phút ở nhiệt độ phòng, loại dịch nổi. Tủa được hoà lại trong dung dịch đệm chứa 50 mM PBS, pH 7,4; 0,5 mg/mL BSA và 0,1% sodium azide. Trộn đều và bảo quản hỗn hợp ở 4°C.

**Phương pháp phát hiện *Leptospira* bằng bộ sinh phẩm Lepto-LAT**

Chuẩn bị lam kính và ghi tên mẫu tại vị trí test. Nhỏ 10 µL dung dịch hạt latex đã hoạt hoá vào vị trí test. Tiếp tục nhỏ 10 µL mẫu huyết thanh vào dung dịch hạt latex, dùng tăm trộn vòng tròn theo chiều kim đồng hồ để tạo dung dịch đồng nhất. Đảo nhẹ trong 5 phút, quan sát hiện tượng ngưng kết. Mẫu có sự ngưng kết tạo hạt gọi là mẫu dương, mẫu không có phản ứng ngưng kết xảy ra mà tạo dịch đồng nhất gọi là mẫu âm. Các mẫu có quan sát thấy tạo hạt nhưng không rõ ràng cần được lặp lại 2 lần mới kết luận.

### Phương pháp tính độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ sinh phẩm

Độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ sinh phẩm sẽ được đánh giá dựa trên panel mẫu tự xây dựng và so sánh với phương pháp chuẩn vàng vi ngưng kết MAT. Độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ sinh phẩm được tính theo công thức sau (Altman, Bland, 1994):

- Độ nhạy = số trường hợp dương tính thật/(số trường hợp dương tính thật + số trường hợp âm tính giả).

- Độ đặc hiệu = Số trường hợp âm tính thật/(số trường hợp âm tính thật + số trường hợp dương tính giả).

### KẾT QUẢ

#### Phân tích mẫu huyết thanh bằng phương pháp MAT

Dựa trên tiêu chuẩn chẩn đoán của MAT, tỷ lệ phần trăm mẫu huyết thanh âm tính và dương tính được tổng kết ở Bảng 2. Trong tổng số 192 mẫu huyết thanh, 50,52% (97/192) mẫu huyết thanh có kết quả dương tính với hiệu giá  $\geq 1:100$ , không có mẫu huyết thanh nào có kết quả dương

tính với hiệu giá 1:400 (0/192) và 49,48% (95/192) mẫu huyết thanh có kết quả âm tính.

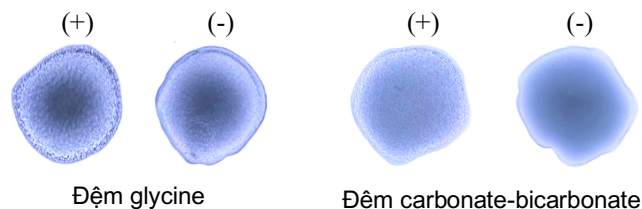
Tất cả các mẫu huyết thanh có kết quả dương tính với hiệu giá 200 bằng phương pháp MAT đã được khẳng định dương tính bằng test nhanh *Leptospira* IgM Ab Test Kit (Zhenrui Biotechnology, Trung Quốc). Đây là bộ kit đang được áp dụng trong chẩn đoán phát hiện *Leptospira* tại các phòng khám thú y của Việt Nam. Tổng số 15 mẫu được sử dụng để nghiên cứu chế tạo bộ kit Lepto-LAT phát hiện nhiễm *Leptospira* bằng phản ứng ngưng kết hạt latex.

#### Khảo sát hệ đệm phù hợp cho hoạt hóa hạt latex

Kháng nguyên LigB tái tổ hợp sau khi được tinh sạch thành công bằng sắc ký ái lực đã được tiến hành thẩm tách loại muối để làm nguyên liệu chế tạo bộ sinh phẩm Lepto-LAT phát hiện nhiễm *Leptospira* (Lê Thị Lan Anh *et al.*, 2019). Hàm lượng LigB tái tổ hợp sau thẩm tách được định lượng bằng phương pháp Bradford với nồng độ 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Protein LigB này được sử dụng để hoạt hóa hạt latex. Để tiến hành gắn protein LigB lên hạt latex, chúng tôi sử dụng 2 loại đệm phổ biến gồm glycine và đệm carbonate-bicarbonate. Quá trình gắn protein LigB lên hạt latex được trình bày trong phần phương pháp.

**Bảng 2.** Kết quả MAT trên mẫu huyết thanh bò, lợn.

Hiệu giá MAT	Số mẫu huyết thanh (N = 192)	Tỷ lệ phần trăm (%)
Hiệu giá 400	0	0%
Hiệu giá 200	15	7,81%
Hiệu giá 100	82	42,71%
Không xác định (hiệu giá < 100)	95	49,48%



**Hình 1.** Khảo sát ảnh hưởng của đệm hoạt hóa hạt latex lên phản ứng ngưng kết. (+), Mẫu huyết thanh dương tính với *Leptospira*; (-), Mẫu huyết thanh âm tính với *Leptospira*.

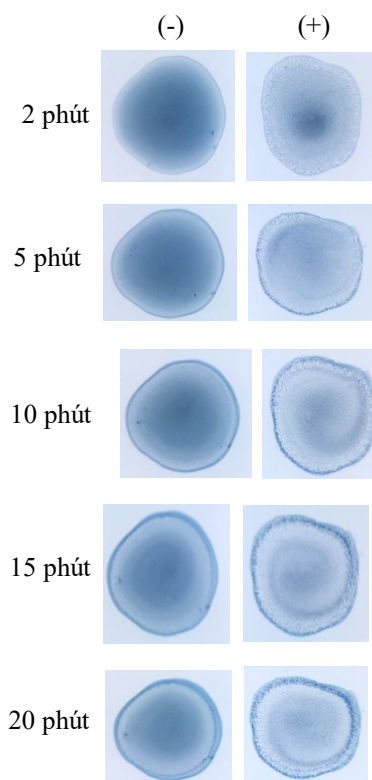
Sau khi gắn thành công tạo hỗn hợp LigB-hạt latex (dung dịch hạt latex hoạt hoá), chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng ngưng kết hạt latex với kháng thể kháng LigB trong các mẫu huyết thanh chuẩn. Hai mẫu huyết thanh chuẩn đã được xét nghiệm chẩn đoán dương tính (hiệu giá kháng thể 1/200) bằng MAT và test nhanh IgM và âm tính với *Leptospira* bằng phương pháp MAT được sử dụng để đánh giá phản ứng ngưng kết hạt latex trên 2 hệ đệm. Kết quả trên Hình 1 cho thấy, tại mẫu dương tính đều quan sát thấy hiện tượng ngưng kết hạt latex khi hoạt hoá trong cả 2 loại đệm và phản ứng ngưng kết xảy ra khi hoạt hoá trong đệm glycine rõ rệt hơn trong đệm carbonate-bicarbonate. Tuy nhiên, trong mẫu âm tính cũng quan sát thấy phản ứng ngưng kết xảy ra khi hoạt hoá hạt latex bằng đệm glycine, trong khi phản ứng tạo hỗn hợp đồng nhất được quan sát khi hoạt hoá bằng đệm carbonate-bicarbonate. Như vậy, mặc dù phản ứng ngưng kết trong đệm glycine xảy ra mạnh hơn, rõ rệt hơn nhưng không đặc hiệu, dễ gây hiện tượng dương tính giả. Do vậy, dung dịch đệm carbonate-bicarbonate được sử dụng để hoạt hoá hạt latex.

#### Khảo sát thời gian đọc kết quả của bộ sinh phẩm Lepto-LAT

Sau khi lựa chọn được hệ đệm phù hợp cho hoạt hoá hạt latex, chúng tôi tiến hành khảo sát thời gian đọc kết quả của bộ sinh phẩm. Để tiến hành thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng mẫu huyết thanh chuẩn là mẫu dương tính và âm tính với *Leptospira* được chẩn đoán bằng phương pháp chuẩn vàng MAT và test nhanh *Leptospira* IgM Ab Test Kit (Zhenrui Biotechnology, Trung Quốc). Sau khi tiến hành trộn mẫu huyết thanh chuẩn vào hạt latex đã hoạt hoá trên lam kính với tỷ lệ 1:1 (15  $\mu$ L: 15  $\mu$ L), đảo đều mẫu và đọc kết quả sau 2 phút, 5 phút, 10 phút, 15 phút và 20 phút. Kết quả được trình bày trong Hình 2.

Kết quả trong Hình 2 cho thấy, sau 2 phút đã quan sát thấy hiện tượng ngưng kết hạt latex xảy ra ở mẫu dương và không thấy ngưng kết ở mẫu âm. Tuy nhiên, sự ngưng kết chưa thật sự rõ rệt. Khi tăng thời gian lên 5 phút, sự ngưng kết xảy ra rõ ràng hơn và không quan sát thấy ngưng kết ở mẫu âm. Tương tự khi tăng thời gian lên 10 phút, 15 phút và 20 phút cho thấy không có sự khác nhau nhiều về hiện tượng

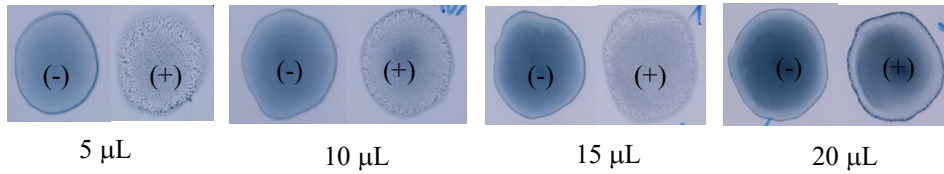
ngưng kết ở mẫu dương, nhưng có sự ngưng kết nhẹ xuất hiện ở mẫu âm, đặc biệt là sau 20 phút. Do vậy, chúng tôi lựa chọn 5 phút là thời gian đọc kết quả cho bộ sinh phẩm. Đây cũng là thời gian được áp dụng nhiều cho các kit ngưng kết hạt latex hiện nay.



Hình 2. Kiểm tra thời gian đọc kết quả của bộ sinh phẩm Lepto-LAT

#### Khảo sát lượng mẫu cần thiết cho phản ứng ngưng kết

Hạt latex sau hoạt hoá được tiến hành phản ứng ngưng kết bằng cách trộn với dung dịch huyết thanh theo tỷ lệ 1:1. Lượng hạt latex hoạt hoá và lượng huyết thanh trong các phản ứng ngưng kết trong các nghiên cứu cũng như các kit thương mại dao động từ 10 đến 20  $\mu$ L. Để lựa chọn được lượng huyết thanh và lượng hạt latex trong bộ sinh phẩm phù hợp đồng thời giảm giá thành của bộ sinh phẩm, trong thí nghiệm này, lượng huyết thanh và hạt latex được sử dụng là 5; 10; 15 và 20  $\mu$ L. Thời gian ngưng kết là 5 phút. Kết quả được trình bày trong Hình 3.



**Hình 3.** Khảo sát lượng mẫu sử dụng cho bộ sinh phẩm

Kết quả trên Hình 3 cho thấy, với lượng mẫu và hạt latex sử dụng là 5 µL, hiện tượng ngưng kết đã quan sát rất rõ ở mẫu đối chứng dương và không quan sát thấy ở đối chứng âm. Kết quả tương tự như khi tăng lượng mẫu lên 10 µL; 15 µL và 20 µL. Như chúng ta thấy, sau khi bổ sung mẫu và dung dịch hạt latex, thao tác trộn nhẹ và đều để tạo dung dịch đồng nhất đóng vai trò quan trọng trong hình thành ngưng kết với hạt latex. Với lượng mẫu nhỏ thao tác trộn mẫu dễ dàng hơn, đều hơn và nhanh hơn. Trong thí nghiệm này lượng mẫu là 5 µl đã có thể quan sát rõ hiện tượng ngưng kết và đọc phản ứng, do đó lượng mẫu này đã được lựa chọn.

#### Tính độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ sinh phẩm

Để đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ sinh phẩm, bộ panel mẫu chuẩn gồm 97 mẫu huyết thanh

dương tính và 95 mẫu huyết thanh âm tính được xét nghiệm bằng phương pháp chuẩn vàng MAT đã được sử dụng. Các mẫu huyết thanh này được tiến hành phản ứng ngưng kết hạt latex sử dụng bộ sinh phẩm Lepto-LAT. Kết quả cho thấy trong số 97 mẫu huyết thanh xác định dương tính với *Leptospira* bằng MAT, sử dụng bộ sinh phẩm Lepto-LAT phát hiện 89 mẫu dương tính với *Leptospira*. Để đánh giá độ đặc hiệu của bộ sinh phẩm Lepto-LAT, 95 mẫu huyết thanh được xác định âm tính với *Leptospira* bằng xét nghiệm MAT truyền thống đã được sử dụng. Kết quả cho thấy phát hiện được 87 mẫu âm tính bằng bộ sinh phẩm Lepto-LAT. Dựa vào công thức tính độ nhạy và độ đặc hiệu, bộ sinh phẩm Lepto-LAT phát hiện *Leptospira* có độ nhạy 91,75% và độ đặc hiệu là 91,57% so với phương pháp MAT chuẩn vàng.

**Bảng 3.** Kết quả đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ sinh phẩm Lepto-LAT.

	Thử nghiệm	Lepto-LAT test		Tổng
		(+)	(-)	
MAT test	(+)	89	08	97
	(-)	08	87	95
	Tổng	97	95	192
Độ nhạy (S) = 91,75%		Độ đặc hiệu (Q) = 91,57 %		
Giá trị tiên đoán âm tính NPV = 91,57%		Giá trị tiên đoán dương tính PPV = 91,75%		

#### THẢO LUẬN

*Leptospirosis* là bệnh nhiễm khuẩn cấp tính xuất hiện chủ yếu ở vùng khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới do xoắn khuẩn *Leptospira* spp. gây ra. Theo tổ chức Y tế thế giới WHO cứ 100.000 người sống ở khu vực khí hậu nóng sẽ có 0,1 đến 1 người bị nhiễm *Leptospira* mỗi năm và con số này sẽ tăng lên đến 10 hoặc hơn ở khu vực khí

hậu nhiệt đới đặc biệt khi dịch xảy ra thì con số này có thể lên đến 100 người hoặc hơn trên tổng số 100.000 người. Hiện nay, việc chẩn đoán *Leptospira* tại Việt Nam chủ yếu là phương pháp vi ngưng kết MAT, đây được đánh giá là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán nhiễm *Leptospira*. Mặc dù có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, nhưng quy trình MAT phức tạp, đòi hỏi cán bộ có chuyên môn cao, trang thiết bị chuyên dụng khó

áp dụng rộng rãi. Chẩn đoán nhiễm *Leptospira* bằng ELISA đã được nghiên cứu và sử dụng, tuy nhiên cũng giống như MAT, phương pháp ELISA đòi hỏi thiết bị đọc ELISA và cán bộ chuyên môn chỉ áp dụng tại các Viện nghiên cứu và các bệnh viện lớn. Do đó, yêu cầu đặt ra cho các nhà nghiên cứu là tạo bộ sinh phẩm cho phép phát hiện nhanh *Leptospira* với thao tác thực hiện đơn giản, có thể áp dụng tại các cơ sở y tế hoặc các hộ chăn nuôi nhỏ. Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn đó, phương pháp ngưng kết hạt latex đã ra đời và được chứng minh có thể thay thế cho các phương pháp MAT và ELISA trong chẩn đoán nhiễm *Leptospira*. Trong nghiên cứu trước, kháng nguyên LigB của *Leptosira* đã được chế tạo thành công bằng công nghệ DNA tái tổ hợp với độ sạch trên 98%. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả thiết lập quy trình tạo bộ kit Lepto-LAT phát hiện nhiễm *Leptospira* dựa vào phản ứng ngưng kết hạt latex. Protein LigB tái tổ hợp được hoạt hóa trong đệm glycine và carbonate-bicarbonate, đây là hai loại đệm được sử dụng phổ biến để hoạt hóa hạt latex (Deneke *et al.*, 2014; Dey *et al.*, 2007; Shekatkar *et al.*, 2010). Kết quả cho thấy LigB được hoạt hóa tốt trong đệm carbonate-bicarbonate, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Shekatkar và đồng tác giả (2010). Thời gian đọc kết quả và hàm lượng kháng nguyên sử dụng là hai thông số quan trọng trong thiết lập bộ sinh phẩm Lepto-LAT phát hiện nhiễm *Leptospira*. Kết quả khảo sát cho thấy sau 5 phút đã quan sát thấy hiện tượng ngưng kết hạt latex xảy ra ở mẫu dương và không thấy ngưng kết ở mẫu âm. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Smits và đồng tác giả (2000), Deneke và đồng tác giả (2014). Đặc biệt, khoảng thời gian 5 phút cũng là khoảng thời gian phổ biến cho ngưng kết hạt latex trong các kit ngưng kết hiện nay. Hàm lượng kháng nguyên và mẫu được khảo sát gồm 5; 10; 15 và 20  $\mu\text{L}$ , đây cũng là hàm lượng được đề cập đến trong các nghiên cứu trong đó lượng mẫu từ 10 đến 15  $\mu\text{L}$  đã được khuyến cáo trong các bộ kit thương mại hoá (Deneke *et al.*, 2014; Nagalingam *et al.*, 2015; Shekatkar *et al.*, 2010; Smits *et al.*, 2000). Sau khi thiết lập được các cấu thành của bộ sinh phẩm, 192 mẫu huyết thanh lợn, bò được xác định dương tính và âm tính bằng

MAT đã được sử dụng để đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ kit. Bộ kit Lepto-LAT có độ nhạy 91,75% và độ đặc hiệu là 91,57% so với phương pháp MAT chuẩn vàng. Các nghiên cứu khác cho thấy phát hiện *Leptospira* bằng ngưng kết hạt latex sử dụng LigB làm nguyên liệu có độ nhạy dao động từ 75,65% tới 93,68% và độ đặc hiệu dao động từ 91,27% đến 94,6% (Deneke *et al.*, 2014; Nagalingam *et al.*, 2015; Shekatkar *et al.*, 2010; Smits *et al.*, 2000). Như vậy, so với các nghiên cứu khác thì bộ sinh phẩm Lepto-LAT có độ nhạy và độ đặc hiệu tương đối cao, có khả năng áp dụng trong sàng lọc và phát hiện nhiễm *Leptospira* trên động vật.

## KẾT LUẬN

Các thông số cấu thành của bộ kit Lepto-LAT sau tối ưu, khảo sát là hoạt hóa LigB trong đệm 0,06 M carbonate-bicarbonate. Thời gian đọc kết quả của bộ sinh phẩm Lepto-LAT là 5 phút. Lượng mẫu huyết thanh sử dụng cho mỗi lần test là 5 - 10  $\mu\text{L}$ . Bộ sinh phẩm Lepto-LAT có độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 91,75% và 91,57%.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu KH&CN cấp Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga: “Nghiên cứu quy trình tạo bộ sinh phẩm Lepto-LAT phát hiện nhiễm xoắn khuẩn *Leptospira*” do TS. Lê Thị Lan Anh chủ trì.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Altman DG, Bland JM (1994) Statistics Notes: Diagnostic tests 1: Sensitivity and specificity. *BMJ* 308(6943), 1552. <https://doi.org/10.1136/bmj.308.6943.1552>
- Ambily R, Mini M, Siju J, Vamshikrishna S, Abhinay G, Gleeja VL, Sunanda C (2019) Utility of recombinant LipL41 based IgM and IgG ELISA in diagnosis of canine leptospirosis in an endemic area – a study from Kerala, India. *Trop Biomed* 36(3): 654–663.
- Behera S, Sabarinath T, Kumar A, Ali SA, Chaudhuri P (2016) Evaluation of Recombinant LigB Based In-house Latex Agglutination Assay for Serosurveillance of Canine Leptospirosis. *J Vet Pub Health* 14(1): 19–23.

- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko AI (2015) Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 9(9): e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
- Croda J, Ramos JGR, Matsunaga J, Queiroz A, Homma A, Riley LW, Haake DA, Reis MG, Ko AI (2007) Leptospira immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *J Clin Microbiol* 45(5): 1528–1534. <https://doi.org/10.1128/JCM.02344-06>
- Deneke Y, Sabarinath T, Gogia N, Lalsiamthara J, Viswas KN, Chaudhuri P (2014) Evaluation of recombinant LigB antigen-based indirect ELISA and latex agglutination test for the serodiagnosis of bovine leptospirosis in India. *Mol Cell Prob* 28(4): 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.01.001>
- Dey S, Madhan Mohan C, Ramadass P, Nachimuthu K (2007) Recombinant antigen-based latex agglutination test for rapid serodiagnosis of leptospirosis. *Vet Res Commun* 31(1): 9–15. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3364-7>
- Nagalingam M, Thirumalesh SRA, Kalleshmurthy T, Niharika N, Balamurugan V, Shome R, Sengupta PP, Shome BR, Prabhudas K, Rahman H (2015) Comparative evaluation of recombinant LigB protein and heat-killed antigen-based latex agglutination test with microscopic agglutination test for diagnosis of bovine leptospirosis. *Trop Anim Health Prod* 47(7): 1329–1335. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0867-7>
- Palaniappan RUM, Chang YF, Hassan F, McDonough SP, Pough M, Barr SC, Simpson KW, Mohammed HO, Shin S, McDonough P, Zuerner RL, Qu J, Roe B (2004) Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *J Med Microbiol* 53(10): 975–984. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45568-0>
- Qiu X, Xu H, Guo Z, Wang J, Yan J (2008) Establishment and application of ELISAs based on rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 fusion antigen of *Leptospira interrogans*. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 37(6): 592–598. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19084957/>
- Shekatkar S, Acharya NS, Harish BN, Parija SC (2010) Comparison of an in-house latex agglutination test with IgM ELISA and MAT in the diagnosis of leptospirosis. *Indian J Med Microb* 28(3): 238–240. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.66484>
- Smits HL, Van Der Hoorn MAWG, Goris MGA, Gussenhoven GC, Yersin C, Sasaki DM, Terpstra WJ, Hartskeerl RA (2000) Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 38(3): 1272–1275. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.3.1272-1275.2000>
- Lê Thị Lan Anh, Minh Thị Hằng, Nguyễn Thị Thu Hiền, Phạm Thị Hà Giang, Triệu Phi Long, Lê Thị Vân Anh, Đào Thị Hà Thanh, Cán Thị Thu Thủy, Nguyễn Hữu Đức (2019) Tách dòng, biểu hiện và tinh sạch kháng nguyên LigB của xoắn khuẩn *Leptospira* trong tế bào *Escherichia coli*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 17(3): 569–575.

## DEVELOPMENT OF AN IN-HOUSE LEPTO-LAT KIT FOR SCREENING AND DETECTION OF *LEPTOSPIRA* INFECTION

Le Thi Lan Anh<sup>1</sup>, Vu Thi Thuong<sup>1</sup>, Pham Thi Ha Giang<sup>1</sup>, Bui Thi Thanh Nga<sup>1</sup>, Minh Thi Hang<sup>2</sup>, Trieu Phi Long<sup>3</sup>, Dao Thi Ha Thanh<sup>4</sup>, Le Thi Van Anh<sup>5,6</sup>, Nguyen Huu Duc<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Vietnam Russia Tropical Center

<sup>2</sup>Vietnam National University of Agriculture

<sup>3</sup>Institute of Army Preventive Medicine

<sup>4</sup>National Institute of Veterinary Research

<sup>5</sup>Journal of Biotechnology, Publishing House for Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>6</sup>Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

### SUMMARY

*Leptospirosis* is a common zoonotic disease in the tropics and subtropics. *Leptospira* infected



human without prompt detection and treatment will face serious consequences such as acute hepatitis-kidneys, pulmonary hemorrhage which can lead to death. Besides the MAT gold standard method, *Leptosipra* antigens developed by DNA recombination technology have been widely studying and applying in diagnosis of *Leptosipra* infection in human and animal. Overcoming the disadvantages of MAT and ELISA such as complicated protocol, which requires highly qualified staff and specialized equipment, the latex agglutination method has been studied and widely used in detecting pathogens such as *Salmonella*, *E. coli*, *Leptosipra* in the world. The advantages of this method are simple operation, fast and cheap. In the previous article, we expressed *Leptosipra* LigB antigen in *E. coli* cells and successfully purified it by affinity chromatography with 98% purity. In this paper, we present the process for establishment of a Lepto-LAT kit to detect *Leptosipra* infection in dogs. This kit had the sensitivity and specificity of 91.75% and 91.57%, respectively.

**Keywords:** latex agglutination, *Leptosipra*, MAT, sensitivity, specificity