

CHẨN ĐOÁN LEPTOSPIRA GÂY BỆNH TRÊN GIA SÚC BẰNG PHƯƠNG PHÁP REAL-TIME PCR

Võ Thành Thìn, Nguyễn Hữu Tình, Đào Duy Hưng,
Đặng Văn Tuấn, Phạm Trung Hiếu
Phân viện thú y miền Trung

Tóm tắt

Leptospirosis là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, truyền lây giữa người và gia súc. Việc chẩn đoán bệnh thường gặp rất nhiều khó khăn và nhầm lẫn do biểu hiện triệu chứng rất đa dạng. Để khắc phục những hạn chế này, phương pháp Real-time PCR (RT-PCR) sử dụng mẫu dò TaqMan và cặp mồi phát hiện gen 16sRNA của *Leptospira* đã được chuẩn hóa. Phản ứng đã được thử nghiệm trên 15 serovar *Leptospira* có khả năng gây bệnh, 1 serovar *Leptospira* không gây bệnh và một số chủng vi khuẩn khác. Phản ứng RT-PCR này đặc hiệu với *Leptospira*, có thể phân biệt được các serovar gây bệnh và không gây bệnh. Ứng dụng phương pháp này để phát hiện *Leptospira* trong mẫu bệnh phẩm thận lợn lấy ở lò mổ tại Khánh Hòa và Kon Tum cho thấy tỷ lệ mẫu dương tính là 16,1%.

Từ khóa: Lợn, *Leptospira*, Serovar, Real-time PCR

DIAGNOSTIC OF PATHOGENIC LEPTOSPIRA BY USING REAL-TIME PCR

Vo Thanh Thinh, Nguyen Huu Tinh, Dao Duy Hung,
Dang Van Tuan, Pham Trung Hieu

Summary

Leptospirosis is an emerging zoonosis disease. The differential diagnosis of this disease is difficult due to the varied symptoms which may result in a missed or delayed diagnosis. In order to overcome these limitations, a real-time PCR assay was optimized using a TaqMan probe and primer target on 16s RNA of *Leptospira*. 15 pathogenic and 1 non-pathogenic *Leptospiral* serovars and some other bacteria strains were tested. The assay was specific for *Leptospira* and may discriminate pathogenic and non-pathogenic species. Applied this assay to detect *Leptospiral* DNA from pig kidney specimens shown that there were 16,1% of specimens collected in slaughter house in Khanh Hoa and Kon Tum provinces to be positive.

Key words: Pig, *Leptospira*, Serovar, Real-time PCR

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh do *Leptospira* là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, lây lan giữa người và gia súc, được OIE xếp vào nhóm thứ 2 các bệnh nguy hiểm (OIE Terrestrial manual, 2008). Bệnh do xoắn khuẩn thuộc giống *Leptospira* gây ra. Giống này có 13 loài là *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii*, *L. wolffii*. Trong đó, loài *L. interrogans* và *L. fainei* được xem là có độc lực cao nhất trên người và động vật (Adler và Moctezuma, 2010). Dựa cấu trúc đặc hiệu của kháng nguyên LPS trên bề mặt tế bào và cấu trúc di truyền của *Leptospira*, có hơn 260 serovar khác nhau đã được xác định, trong đó có nhiều serovar gây bệnh cho vật nuôi (Levett, 2001). Các serovar gây bệnh thường gặp ở lợn là *bratislava*, *grippotyphosa*, *canicola*, *tarassovi*, *icterohaemorrhagiae*, *australis*, *pomona*; ở bò là *hardjo*, *pomona*, *australis*, *bratislava*, *sejroe*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae*, *canicola*; ở chó là *canicola*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona*, *copenhageni*; ở ngựa là *pomona*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae*, *hardjo*; ở cừu là *pomona*, *hardjo* (Faine và cs., 1999; Levett, 2001; Adler và Moctezuma, 2010).

Gia súc mắc bệnh thường rất ít thể hiện triệu chứng và triệu chứng có thể biểu hiện khác nhau ở từng có thể (Levett, 2001). Vì thế, việc chẩn đoán bệnh trong phòng thí nghiệm là rất cần thiết. Một trong những phương pháp sử dụng phổ biến là phát hiện kháng

thể kháng *Leptospira* đặc hiệu trong huyết thanh bằng phản ứng vi ngưng kết tan trên phiến kính (MAT – microscopic agglutination test). Ngoài ra, có thể phát hiện kháng thể bằng phản ứng ngăn trở gián tiếp hồng cầu - ELISA. *Leptospira* có thể phân lập trực tiếp từ mẫu bệnh phẩm hoặc phát hiện bằng kính hiển vi nền đen, nhuộm miễn dịch (Faine, 1999, Levett, 2001). Hiện nay, kỹ thuật PCR và Real time-PCR (RT-PCR) cũng được sử dụng rộng rãi để chẩn đoán bệnh do *Leptospira* gây ra ở gia súc (Levett và cs., 2005; Adler và Moctezuma, 2010). Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng quy trình chẩn đoán *Leptospira* bằng kỹ thuật RT-PCR với cặp mồi và mẫu dò TaqMan (TaqMan probe) được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide gen 16s rRNA của các serovar *Leptospira* gây bệnh trên gia súc.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Thiết lập phản ứng RT-PCR để chẩn đoán xoắn khuẩn *Leptospira* gây bệnh trên gia súc.
- Ứng dụng phản ứng RT-PCR để phát hiện *Leptospira* trong mẫu bệnh phẩm

2.2. Nguyên liệu nghiên cứu

- Mẫu bệnh phẩm: mẫu thận lợn lấy từ lò mổ
- Mẫu DNA *Leptospira* chuẩn: do Viện thú y Italia (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Italy – Viện IZSve) cung cấp.
- Các chủng *Leptospira* gồm 16 serovar do Viện IZSve (Italia) và Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh cung cấp: *pomona*, *bataviae*, *panama*, *autumnalis*, *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *tarassovi*, *gryppotyphosa*, *australis*, *hebdomadis*, *javanica*, *pyrogenes*, *copenhageni*, *hardjo*, *bratislava*, *patoc*.
- DNA của các chủng vi khuẩn *E. coli*, *C. perfringens*, *P. multocida*, *S. typhimurium* do Bộ môn Vi trùng – Phân viện thú y miền Trung cung cấp.
- Các loại hóa chất, sinh phẩm dùng để chiết tách DNA, thực hiện phản ứng RT-PCR.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Chiết tách DNA *Leptospira* bằng bộ Kit *High pure PCR template preparation* do Roche (Đức) sản xuất. Nồng độ DNA sau chiết tách được xác định bằng máy quang phổ kế.
- Phản ứng RT-PCR được chuẩn hóa dựa trên mẫu DNA *Leptospira* chuẩn do Viện IZSve cung cấp trên hệ thống máy RT-PCR IQ5 (Bio-Rad - USA). Phản ứng RT-PCR sử dụng cặp mồi và mẫu dò phát hiện đoạn gen 87 bp trên 16S rRNA (bảng 1). Thể tích phản ứng là 25µl, gồm: 12,5µl TaqMan Master mix (AB system), 1,5µl mồi xuôi/ngược (IDT, USA), 2,5µl mẫu dò (Roche), 6µl nước và 1µl mẫu DNA. Thực hiện phản ứng khuếch đại ở 40 chu kỳ với các bước là 95°C/ 15 giây và 60°C/ 1 phút.
- Phát hiện *Leptospira* trong mẫu bệnh phẩm (thận) bằng phản ứng RT-PCR sau khi đã được thiết lập.

Bảng 1. Trình tự nucleotid các cặp mồi/ mẫu dò dùng trong phản ứng RT-PCR

Phản ứng	Gen	Trình tự nucleotide của mồi / mẫu dò (5' → 3')	
RT-PCR	16s RNA	Mồi xuôi	CCC GCG TCC GAT TAG
		Mồi ngược	TCCATTGTGGCCGR ^{A/G} ACAC
		Mẫu dò	(FAM) CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGC (TAMRA)

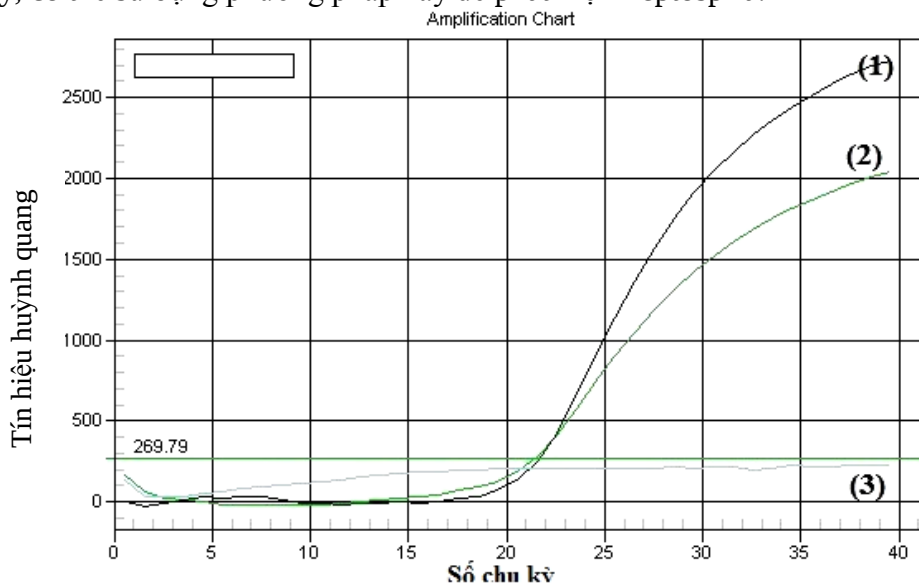
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Chuẩn hóa phản ứng RT-PCR

3.1.1 Xác nhận giá trị phương pháp RT-PCR

Giá trị của phương pháp RT-PCR được xác nhận dựa trên mẫu DNA *Leptospira* chuẩn do Viện IZSve (Italia) cung cấp. Theo hướng dẫn của Viện IZSve, giá trị Ct (chu kỳ ngưỡng) của phản ứng RT-PCR là 9-25. Sau khi thực hiện phản ứng, chúng tôi nhận được giá trị Ct là 21,43 – 21,67 (hình 1). Như vậy, giá trị phản ứng RT-PCR trong nghiên cứu

của chúng tôi phù hợp với tiêu chuẩn của đơn vị cung cấp mẫu DNA *Leptospira* chuẩn. Như vậy, có thể sử dụng phương pháp này để phát hiện *Leptospira*.



Hình 1. Đồ thị biểu diễn giá trị phương pháp RT-PCR

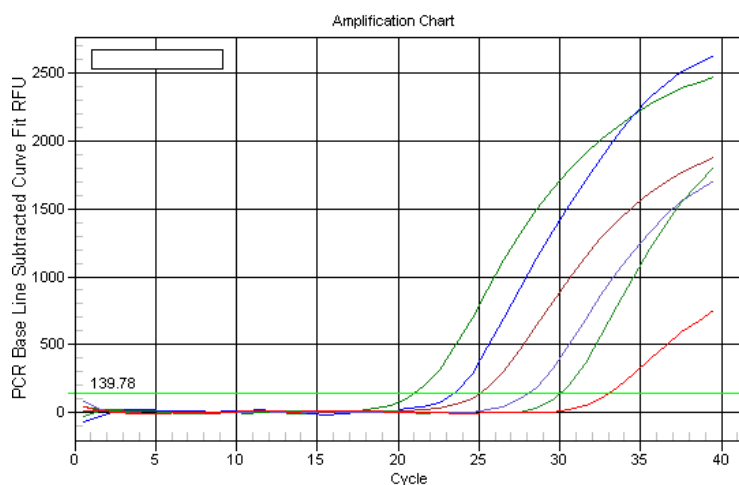
(1): mẫu DNA *Leptospira* chuẩn, $C_t = 21,67$, (2): mẫu DNA *Leptospira* chuẩn, $C_t = 21,43$

3.1.2- Xác định hiệu quả khuếch đại và đường chuẩn tuyến tính (R^2) của phản ứng RT-PCR

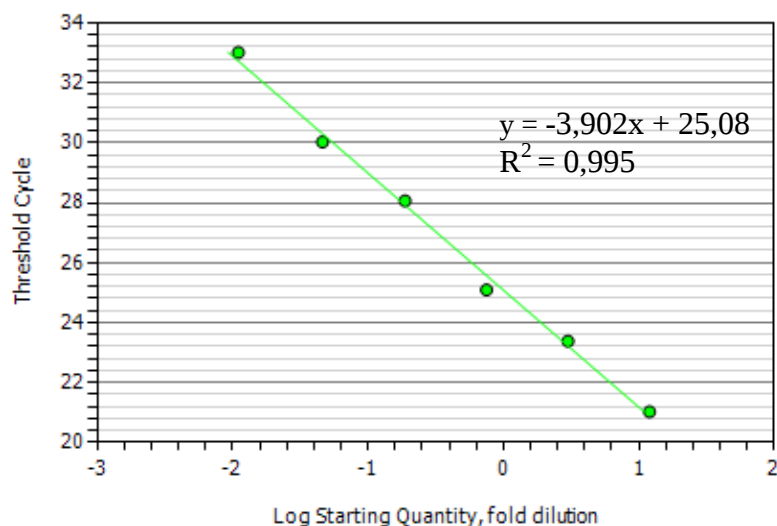
Theo Adams (2006) và Bio-Rad (2006), tiêu chuẩn của một phản ứng RT-PCR tối ưu cần phải đạt là *đường chuẩn tuyến tính* ($R^2 > 0,98$), *hiệu quả khuếch đại* đạt cao (90 – 105%) và *mức độ đồng nhất qua các lần phản ứng lặp lại*. Để đánh giá các chỉ tiêu này, chúng tôi đã pha loãng mẫu DNA *Leptospira* chuẩn (đã biết nồng độ DNA) theo cơ số 2, sau đó tiến hành phản ứng RT-PCR trên hệ thống IQ5 (Bio-Rad), mỗi độ pha loãng được lặp lại 3 lần. Đường chuẩn được thiết lập từ giá trị logarit lượng DNA ban đầu của từng độ pha loãng với giá trị C_t . Hiệu quả khuếch đại được tính toán từ độ dốc của đường chuẩn. Kết quả thực hiện phản ứng RT-PCR trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy (hình 2 và 3):

- Phương trình đường chuẩn tuyến tính: $y = -3,902x + 25,08$; $R^2 = 0,995$
- Hiệu quả khuếch đại: 95,5%
- Kết quả của 3 lần lặp lại: không có sự sai khác giữa các giá trị.

Như vậy, phản ứng rt-PCR trong nghiên cứu của chúng tôi thỏa mãn các tiêu chuẩn như Adams (2006). Vì vậy, có thể ứng dụng phương pháp này trong các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Đồ thị khuếch đại của mẫu DNA đã pha loãng



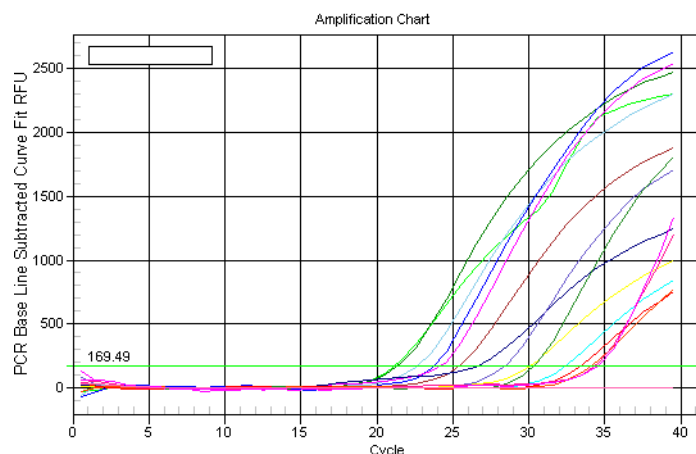
Hình 3. Phương trình đường chuẩn tuyến tính

- 3.1.3 Kết quả kiểm tra độ nhạy của phản ứng RT-PCR

Để đánh giá độ nhạy của phản ứng RT-PCR, chúng tôi tiến hành pha loãng mẫu DNA ở các nồng độ khác nhau, sau đó tiến hành phản ứng. Theo tiêu chuẩn đánh giá của đơn vị cung cấp mẫu DNA *Leptospira* chuẩn, phản ứng RT-PCR được đánh giá dương tính khi giá trị Ct thu được vào khoảng 9-35. Như vậy, giới hạn phát hiện DNA *Leptospira* trong phản ứng RT-PCR là 0,0015 ng/phản ứng (bảng 2 và hình 4).

Bảng 2. Kết quả xác định độ nhạy của phản ứng RT-PCR

TT	Nồng độ DNA (ng/phản ứng)	Giá trị Ct	Kết quả
1	24	21,16	+
2	12	21,33	+
3	6	22,6	+
4	3	23,66	+
5	1,5	24,06	+
6	0,75	25,42	+
7	0,375	26,61	+
8	0,1875	28,4	+
9	0,0938	30,01	+
10	0,0469	30,28	+
11	0,0234	32,42	+
12	0,0117	33,36	+
13	0,0059	34,13	+
14	0,0029	34,31	+
15	0,0015	34,56	+
16	0,00075	35,61	-



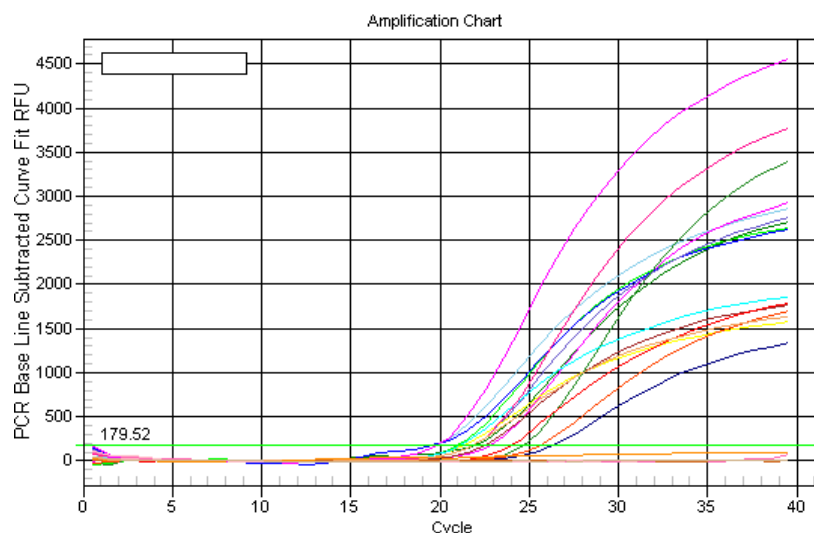
Hình 4. Đồ thị phản ứng RT-PCR xác định độ nhạy

3.1.4- Kết quả xác định tính đặc hiệu của phản ứng

Để xác định tính đặc hiệu của phản ứng RT-PCR dùng trong chẩn đoán *Leptospira*, chúng tôi tiến hành phản ứng trên mẫu DNA của 15 serovar *Leptospira* gây bệnh trên gia súc (*pomona*, *bataviae*, *panama*, *autumnalis*, *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *tarassovi*, *gryppotyphosa*, *australis*, *hebdomadis*, *javanica*, *pyrogenes*, *copenhageni*, *hardjo*, *bratislava*), 1 serovar *Leptospira* không gây bệnh (*patoc*) và DNA của một số chủng vi khuẩn *E. coli*, *C. perfringens*, *P. multocida*, *S. typhimurium*. Kết quả phân tích cho thấy phản ứng RT-PCR chỉ cho kết quả dương tính với mẫu DNA của 15 serovar *Leptospira* gây bệnh. Điều này chứng tỏ 2 phản ứng này đặc hiệu với các chủng *Leptospira* gây bệnh, không xảy ra phản ứng chéo với các serovar *Leptospira* không gây bệnh và các chủng vi khuẩn khác. Các kết quả này được thể hiện trong bảng 3, hình 5.

Bảng 3. Kết quả xác định tính đặc hiệu của phản ứng RT-PCR

TT	Serovar / chủng vi khuẩn	Giá trị Ct	Đánh giá
1	<i>pomona</i>	12,92	+
2	<i>bataviae</i>	21,94	+
3	<i>panama</i>	24,65	+
4	<i>autumnalis</i>	25,67	+
5	<i>canicola</i>	19,91	+
6	<i>icterohaemorrhagiae</i>	22,51	+
7	<i>tarassovi</i>	21,12	+
8	<i>gryppotyphosa</i>	26,3	+
9	<i>australis</i>	21,01	+
10	<i>hebdomadis</i>	21,88	+
11	<i>javanica</i>	21,42	+
12	<i>pyrogenes</i>	22,85	+
13	<i>copenhageni</i>	19,71	+
14	<i>hardjo</i>	23,96	+
15	<i>bratislava</i>	19,84	+
16	<i>patoc</i>	0	-
17	<i>E. coli</i>	0	-
18	<i>C. perfringens</i>	0	-
19	<i>P. multocida</i>	0	-
20	<i>S. typhimurium</i>	0	-



Hình 5. Đồ thị phản ứng RT-PCR xác định tính đặc hiệu

Như vậy, phản ứng RT-PCR đã được chuẩn hóa phù hợp điều kiện phòng thí nghiệm tại Phân viện thú y miền Trung. Phản ứng được tối ưu thỏa mãn các yêu cầu theo quy định, độ nhạy và tính đặc hiệu của phản ứng cũng đã được xác định. Vì vậy, có thể ứng dụng phương pháp này để chẩn đoán *Leptospira* từ mẫu bệnh phẩm.

3.2. Phát hiện *Leptospira* trong mẫu bệnh phẩm

Ứng dụng phương pháp RT-PCR như đã được chuẩn hóa ở trên, chúng tôi tiến hành phát hiện *Leptospira* có trong 205 mẫu bệnh phẩm là thận lợn lấy từ các lò mổ tại 2 tỉnh Khánh Hòa và Kon Tum. Kết quả xét nghiệm được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả phát hiện *Leptospira* trong mẫu bệnh phẩm

TT	Địa điểm	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
1	Kon Tum	101	17	16,83
2	Khánh Hòa	104	16	15,38
Tổng hợp		205	33	16,10

Kết quả bảng 4 cho thấy tỷ lệ mẫu bệnh phẩm lợn tại 2 tỉnh dương tính với *Leptospira* là 16,1%. Mẫu huyết thanh của những lợn này đều cho kết quả dương tính khi phát hiện kháng thể *Leptospira* bằng phản ứng vi ngưng kết MAT. Kết quả phát hiện *Leptospira* trong mẫu bệnh phẩm của chúng tôi thấp hơn nghiên cứu của Boqvist và cs. (2003). Theo tác giả, tỷ lệ nhiễm *Leptospira* trong mẫu bệnh phẩm thận có bệnh tích đại thể (những chấm trắng trên thận) là 71% và 62% mẫu thận không thể hiện bệnh tích khi xét nghiệm bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang phát hiện kháng nguyên *Leptospira*. Trong nghiên cứu của chúng tôi, mẫu bệnh phẩm được lấy từ lợn thịt khỏe mạnh, không thể hiện triệu chứng và bệnh tích bệnh do *Leptospira* tại lò mổ. Do đó, đây có thể là nguồn lây nhiễm nguy hiểm cho người trực tiếp giết mổ và người tiêu dùng.

IV. KẾT LUẬN

- Đã chuẩn hóa được phản ứng Real-time PCR dùng trong chẩn đoán *Leptospira* từ mẫu bệnh phẩm; giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,0015 ng DNA *Leptospira*/phản ứng và chỉ đặc hiệu với các chủng *Leptospira* gây bệnh trên gia súc.
- Đã ứng dụng phương pháp này để chẩn đoán *Leptospira* từ mẫu bệnh phẩm thận lấy tại Khánh Hòa và Kon Tum. Tỷ lệ mẫu bệnh phẩm dương tính với *Leptospira* là 16,1%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adams, P.S., 2006. Data analysis and reporting. In: Real-time PCR, edited by: Dorak, M.T., Taylor and Francis group, 39-62.

2. Adler, B., and Moctezuma, A., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140, 287–296.
3. Bio-Rad laboratories, 2006. Real-time PCR applications guide, 4-6.
4. Boqvist, S., Montgomery, J.M., Hurst, M., Thu, H.T., Engvall, E.O., Gunnarsson, A., Magnusson, U., 2003. *Leptospira* in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. *Vet Microbiol.*, 93(4), 361-368.
5. Faine, S., Adler, B., Bolin, C., and Perolat, P., 1999. Morphology and chemical composition. In: *Leptospira and Leptospirosis*, 2nd edition. MediSci, Melbourne, Australia, 17-28.
6. Levett, P.N., 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Review*, 14(2), 296-326.
7. Levett, PN., Morey, RE., Galloway, RL., Turner, DE., Steigerwalt, AG., and Mayer, LW., 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 45–49.
8. OIE Terrestrial manual, 2008. Chapter 1.1.2: Biosafety and biosecurity in the veterinary microbiology laboratory and animal facilities. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*, 6th edition, 15-26.