

**PHÁT HIỆN NHANH BÀO TỬ VI KHUẨN BACILLUS ANTHRACIS  
BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ MIỄN DỊCH**

*Đến tòa soạn 30 – 12 - 2014*

**Hoàng Thế Yên, Lê Trọng Văn, Nguyễn Thị Nga,  
Trần Minh Trí, Nguyễn Thành Đạt**

*Viện Kỹ thuật Hóa - Sinh và Tài liệu nghiệp vụ, Tổng cục Hậu cần Kỹ thuật, Bộ Công an*

**Đinh Duy Kháng**

*Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

**Bùi Phương Thuận**

*Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc Gia Hà nội*

**SUMMARY**

**RAPID DETECTION OF BACILLUS ANTHRACIS SPORES  
BY IMMUNOCHROMATOGRAPHY METHOD**

*Anthrax in human and animal caused by Bacillus anthracis . It is a dangerous disease. B. Anthracis spores may be using in bioterrorism and bioweapons. Therefore, there is an urgent need for convenient, sensitive, and specific methods to detect the spores of B. Anthracis. This article reports an immunochromatography device based on the principle of sandwich assay (lateral flow test). This test were developed by using monoclonal anti – B. Anthracis spores SA26 and SA27. The spores captured by a monoclonal anti-spore antibody gold conjugated (SA27) in the conjugate pad. This complex will was captured by other monoclonal anti – spore (SA26) coated on the nitrocellulose membrane (sanwhich assay), so T line appear . The solution migrates by capillary action through the test strip. This complex was captured by goat anti – mouse IgG antibody, C line appear. If it was negative (without spores in sample), the T line disappeared. If it was positive (with spores), the T line developed in the T region. This method had high sensitivity and specificity. Result was read rapidly. We chose several appropriate conditions as: concentration of capture reagents on test line and control line, concentration of colloidal conjugated gold on the conjugate pad, treated sample pad, sample extract buffer to make a rapid test. We successfully created a rapid test to detect Bacillus anthracis spores. The limit of detection of spores is  $10^5$  spores/ml. Reading results are set at 15 minutes. Sensitivity is 100% and specificity is 97%. This device is simple and activites in the field. Store the test below room temperature.*

**Keywords:** *Capture reagents, Bacillus anthracis, rapid test, spores, lateral flow test.*

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Bacillus anthracis* là tác nhân gây bệnh than ở người và động vật, thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương có khả năng hình thành bào tử. Trong điều kiện bất lợi về dinh dưỡng, *B. anthracis* thúc đẩy quá trình hình thành bào tử để chống chọi với điều kiện môi trường trong thời gian dài, bao gồm nhiệt độ cao, chiếu xạ liều cao, tác động bởi hóa chất và thậm chí là chân không ngoài không gian (Nicholson *et al.*, 2000). Vì vậy, *B. anthracis* được liệt kê vào danh mục A vũ khí sinh học nguy hiểm bởi Trung tâm kiểm soát phòng ngừa dịch bệnh của Hoa Kỳ. Các sự kiện khủng bố sinh học xảy ra năm 2001 là minh chứng rõ nhất về mối đe dọa của *B. anthracis* đến sức khỏe cộng đồng. Gần đây, các nhà khoa học trên thế giới đã rất quan tâm và phát triển nhiều phương pháp khác nhau để phát hiện nhanh bào tử vi khuẩn than. Các kỹ thuật khác nhau để phát hiện bào tử vi khuẩn than bao gồm kỹ thuật miễn dịch (Mechaly *et al.*, 2008), kỹ thuật PCR (Skottman *et al.*, 2007), hệ thống nhận biết sensor (Garcia-Aljaro *et al.*, 2010) và một số phương pháp khác (Tan *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2011). Các kỹ thuật trên đa phần đòi hỏi phải đi kèm các thiết bị đắt tiền và thao tác phức tạp.

Từ những năm 1990, kỹ thuật phản ứng miễn dịch trên màng được sử dụng rất rộng rãi để phát hiện các loại bệnh truyền nhiễm, các chất gây nghiện, hoặc các chất phân tích trong môi trường có hàm lượng thấp mà không cần các thiết bị phụ trợ của phòng thí nghiệm. Đây là kỹ thuật cho kết

quả xét nghiệm nhanh, đơn giản và giá thành thấp. Kỹ thuật này sử dụng các chất tạo màu như keo vàng, hạt nano bạc, hạt latex, trong đó hạt nano vàng được sử dụng phổ biến nhất tiếp đến là hạt latex (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009), ngoài ra còn hạt từ tính (Lui *et al.*, 2011).

Để phát hiện bào tử vi khuẩn than bằng kỹ thuật miễn dịch trên màng, các hãng thương mại đang cung cấp hai kháng thể đơn dòng SA26 và SA27, được cho là kháng thể khá đặc hiệu với kháng nguyên vỏ bào tử vi khuẩn *B. anthracis*.

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng hai kháng thể đơn dòng kháng vỏ bào tử vi khuẩn *B. anthracis* SA26 và SA27 để chế tạo que thử nhanh phát hiện bào tử vi khuẩn *B. anthracis* phục vụ công tác phát hiện nhanh ngoài hiện trường không cần các thiết bị phụ trợ của phòng thí nghiệm.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Nguyên liệu và hóa chất

Chủng vi khuẩn *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringensis*, *B. anthracis* chủng nhược độc từ phòng thí nghiệm an toàn cấp 3 – Bộ công an. Kháng thể đơn dòng SA26 và SA27 kháng vỏ bào tử vi khuẩn than của hãng Abcam (Mỹ). Kháng thể đa dòng goat anti-mouse của hãng Arista (Mỹ). Màng nitrocellulose của hãng MDI. Hóa chất sử dụng cho các đệm mua của Sigma, Merck. Các loại nguyên liệu: màng PE phức hợp, chất bảo quản, và một số nguyên liệu trong nước. Máy Immunochromato Reader C10066 hãng HAMAMATSU Nhật Bản.

### **Phương pháp nghiên cứu**

Các phương pháp nghiên cứu sử dụng trong chế tạo phát hiện nhanh theo bản quyền công nghệ của hãng Arista (Mỹ). Cụ thể cần phải tiến hành lần lượt các nghiên cứu sau:

#### ***Phương pháp thử nghiệm lựa chọn nguyên liệu phù hợp***

Các nguyên liệu sử dụng trong chế tạo có nhiều loại, nhiều nguồn gốc và tính năng kỹ thuật khác nhau. Mỗi loại que thử xác định cần phải tiến hành thử nghiệm để chọn được các loại nguyên liệu phù hợp. Bên cạnh đó với mỗi loại màng cần phải xử lý bằng đệm trước khi đưa kháng thể lên. Hệ đệm và quy trình xử lý riêng cho mỗi loại màng cũng cần phải xác lập (Jemo, 1996).

#### ***Phương pháp tối ưu các sinh phẩm trải trên màng***

Tối ưu hóa nồng độ chất bắt giữ tại vạch T và vạch C: Chất bắt giữ tại vạch C được pha trong đệm phosphate buffer saline (PBS) 10 mM có pH 7,4 (Jemo, Byungwoo 1996) với nồng độ khác nhau 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/ml. Chất bắt giữ tại vạch T cũng được pha trong hệ đệm PBS có nồng độ 0.1M pH 7,4 thành các nồng độ khác nhau; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/ml. Màng sau khi trải sinh phẩm lên trên sẽ được khóa các liên kết không đặc hiệu bằng dung dịch block phosphat buffer saline bổ sung bovine serum albumine (Fishers, 1998). Kết quả được xác định bằng cường độ vạch màu trên màng nitrocellulose tại vạch T và vạch C.

Tối ưu hóa lượng kháng thể cộng hợp vàng: Lượng kháng thể trên màng mang chất cộng hợp vàng được xác định bằng cách pha loãng ở các tỷ lệ khác nhau, thử nghiệm phản ứng miễn dịch kháng nguyên với kháng thể đặc hiệu trên màng

nitrocellulose và chọn tỷ lệ phù hợp nhất bằng cách so sánh cường độ biểu hiện màu trên hai vạch T và vạch C.

#### ***Phương pháp xây dựng qui trình chế tạo que thử***

Trên cơ sở các số liệu nghiên cứu, tối ưu và các nguyên liệu phù hợp đã lựa chọn để xây dựng qui trình chế tạo que thử phát hiện bào tử than với hệ thống thiết bị ở qui mô phòng thí nghiệm.

#### ***Phương pháp xác định thông số kỹ thuật của que thử***

*Giới hạn phát hiện:* Bào tử vi khuẩn có mật độ được xác định bằng phương pháp pha loãng, cấy gạt và đếm khuẩn lạc trên môi trường thạch. Xác định ngưỡng của que thử là mật độ bào tử thấp nhất mà que cho kết quả dương tính (xuất hiện hai vạch T và C).

*Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu:* Phép thử được lặp đi lặp lại số lượng mẫu thực tế nhất định trên các mẫu giả định để xác định khả năng cho âm tính giả và dương tính giả. Kết quả được tính ra tỷ lệ phần trăm.

*Xác định khả năng phản ứng chéo:* Que thử được kiểm tra với một số bào tử vi khuẩn *B. subtilis*, *B. ceures*, *B. thurigencis* để xác định khả năng phản ứng chéo.

### **3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

#### **Tối ưu hóa nồng độ chất bắt giữ tại vạch T và C**

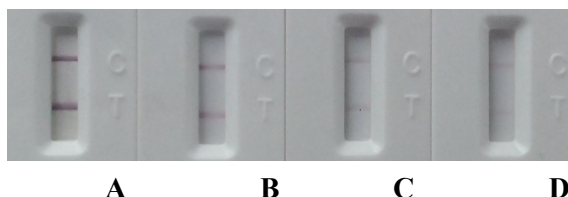
Kháng thể goat anti-mouse nồng độ 7.83 mg/ml pha trong đệm PBS thành các nồng độ 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/ml sử dụng máy chuyên dụng trải lên vạch C của màng nitrocellulose. Kháng thể đơn dòng kháng vỏ bào tử vi khuẩn SA26 có nồng độ 2mg/ml được pha loãng thành các nồng độ 0,3; 0,5; 0,7; 0,9/mg/ml trong đệm PBS 7,4,

được đưa lên màng tại vị trí vạch T. Sau khi đưa hai sinh phẩm lên màng nitrocellulose, màng sẽ được ủ qua đệm tại nhiệt độ 37°C, độ ẩm 10%.

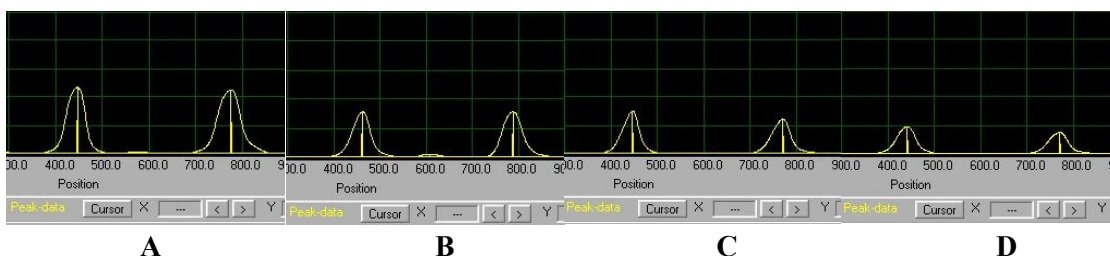
Kháng thể đơn dòng SA27 được cộng hợp hạt vàng kích thước nano theo phương pháp của Slot và Geuze 1985. Sau khi cộng hợp được pha loãng tỷ lệ 1:10. Đây là tỷ lệ pha loãng đảm bảo lượng kháng thể cộng hợp vàng luôn thừa trong phản ứng miễn dịch trên màng.

Các màng được lắp ráp theo trình tự để tạo test và thử nghiệm với dịch chứa bào tử ở mật độ  $10^6$  bào tử/ml.

Kết quả trên (Hình 1) cho thấy, nồng độ chất bắt giữ tại vạch T và vạch C trong khoảng 0,9 và 0,7 mg/ml cho kết quả hiện hai vạch T và vạch C là tốt nhất, thể hiện rõ nét. Ở các nồng độ cao hơn là không cần thiết vì lượng nhiều hơn sẽ gây lãng phí kháng thể không cần thiết. Chúng tôi chọn nồng độ 0,7 mg/ml.



Hình 1. Nồng độ chất bắt giữ vạch tại T và C. A. 0,9 mg/ml; B. 0,7 mg/ml; C. 0,5 mg/ml; D. 0,3 mg/ml.



Hình 2: Biểu đồ peak chất bắt giữ tại vạch C và T đọc trên máy Immunochromato Reader C10066

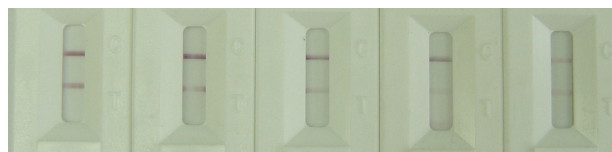
A. 0,9 mg/ml; B. 0,7 mg/ml; C. 0,5 mg/ml; D. 0,3 mg/ml.

### Tối ưu hóa nồng độ kháng thể đơn dòng cộng hợp vàng

Kháng thể SA27 cộng hợp hạt vàng kích thước nano được pha trong đệm PBS có pH 7,4 có tỷ lệ pha loãng khác nhau: (1 : 10); (1 : 15); (1 : 20); (1 : 25); (1 : 30). Dùng máy trải mỗi tỷ lệ lên một đoạn màng chứa chất cộng hợp. Sấy và bảo quản tránh ẩm và ánh sáng. Màng hút mẫu được xử lý bằng đệm PBS 0.01M có pH 8,6 bổ sung

SDS 0,001%. Sấy khô. Hoàn thiện que thử sau đó thử với mẫu. Các màng được lắp ráp theo trình tự để tạo test và thử nghiệm với dung dịch chứa bào tử mật độ  $10^6$  bào tử/ml.

Trong các tỷ lệ pha loãng (Hình 3) chúng tôi chọn tỷ lệ (1:15) cho chất cộng hợp. Các tỷ lệ thấp hơn đều không đảm bảo lượng vàng trên hai vạch T và vạch C. Các tỷ lệ cao hơn cho thấy không cần thiết hai vạch T và C không rõ nét hơn và hóa chất sử dụng nhiều hơn.



**A B C D E**

Hình 3. Tỷ lệ kháng thể cộng hợp vàng tối ưu cho que thử bào tử *B.anthraxis*.

A. (1:10); B. (1:15); C. (1:20); D. (1:25); E. (1:30).

### Xác định giới hạn phát hiện của test

Trong đó mẫu M1 là mẫu nước cất 2 lần, M2 đến M7 có mật độ bào tử khác nhau.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, tại mẫu đối chứng và mẫu M2 các que thử đều cho kết quả âm tính, tại mật độ  $10^4$  bào tử/ml có 1 phép thử cho kết quả xuất hiện vạch T nhưng không rõ nét nên tạm đọc là dương tính, các que thử còn lại không xuất hiện vạch T.

Tại mật độ  $10^5$  đến  $10^8$  bào tử/ml, kết quả cho thấy 100% xuất hiện vạch T trên que thử. Như vậy, giới hạn phát hiện của que thử được xác định là  $10^5$  bào tử/ml.

### Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu

Mẫu bào tử vi khuẩn *B. subtilis*, *B. ceures*, *B. thurigenicis*, *B. anthracis* được chuẩn bị

có mật độ  $10^6$  bào tử/ml. Một số mẫu bột giống các mẫu bột ở hiện trường cũng được thử nghiệm như: bột gạo, bột sắn, bột đất.

Công thức tính độ nhạy:

Số mẫu dương tính thật

Độ nhạy =  $\frac{\text{Số mẫu dương tính thật}}{\text{Số mẫu dương tính thật} + \text{Số mẫu âm tính giả}} \times 100$

Công thức tính độ đặc hiệu: Số mẫu âm tính thật

Độ đặc hiệu =  $\frac{\text{Số mẫu âm tính thật}}{\text{Số mẫu âm tính thật} + \text{Số mẫu dương tính giả}} \times 100$

Số liệu ở (Bảng 2) cho thấy

Độ nhạy =  $100 / [(100 + 0)] \times 100 = 100\%$

Độ đặc hiệu =  $97 / [(97 + 3)] \times 100 = 97\%$ .

Kết quả trên cho thấy, độ nhạy của test đạt 100% còn độ đặc hiệu là 97%.

Bảng 1. Kết quả xác định giới hạn phát hiện của test.

| Mẫu | Mật độ bào tử<br>(bào tử/ml) | Test 1 | Test 2 | Test 3 | Test 4 | Test 5 | Test 6 |
|-----|------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| M 1 | 0                            | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| M 2 | $10^3$                       | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| M 3 | $10^4$                       | -      | -      | -      | +      | -      | -      |
| M 4 | $10^5$                       | +      | +      | +      | +      | +      | +      |
| M 5 | $10^6$                       | +      | +      | +      | +      | +      | +      |
| M 6 | $10^7$                       | +      | +      | +      | +      | +      | +      |
| M 7 | $10^8$                       | +      | +      | +      | +      | +      | +      |

Bảng 2. Kết quả xác định mức độ dương tính giả và âm tính giả.

| Mẫu                                          | Số lần thử | Kết quả    |         |
|----------------------------------------------|------------|------------|---------|
|                                              |            | Dương tính | Âm tính |
| Bào tử                                       |            |            |         |
| <i>B.anthraxis</i> 10 <sup>5</sup> bào tử/ml | 100        | 100        | 0       |
| Mẫu đối chứng âm                             | 100        | 3          | 97      |
| Tổng                                         | 200        | 103        | 97      |

Bảng 3. Phản ứng chéo của que thử đối với một số bào tử vi khuẩn khác.

| Mẫu                   | Kết quả ở các lần lặp lại |   |   |   |   |   |   |
|-----------------------|---------------------------|---|---|---|---|---|---|
|                       | 1                         | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| <i>B. ceures</i>      | -                         | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. subtilis</i>    | -                         | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. thrugiensis</i> | -                         | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. anthracis</i>   | +                         | + | + | + | + | + | + |
| Bột gạo               | -                         | - | - | - | - | - | - |
| Bột đất               | -                         | - | - | - | - | - | - |
| Bột mì                | -                         | - | - | - | - | - | - |

## KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu thực nghiệm chúng tôi đã tối ưu và lựa chọn được nồng độ kháng thể tại hai vạch C và T là 0,7 mg/ml, tỷ lệ pha loãng kháng thể cộng hợp màu 1:15 và nguyên liệu phù hợp cho việc chế tạo.

Đã tạo thành công que thử nhanh bào tử *B. anthracis* với giới hạn phát hiện 10<sup>5</sup> bào tử/ml, có độ nhạy 100% và độ đặc hiệu 97%, thời gian phát hiện 15 phút.

**Lời cảm ơn:** Nhóm đề tài xin chân thành cảm ơn Chương trình đề tài liên Bộ giữa Bộ công an và Bộ Khoa học và Công nghệ đã giúp đỡ kinh phí để chúng tôi hoàn thành nội dung nghiên cứu của đề tài.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Fishers, (1998). “Immunochromatographic, Lateral Flow or Strip Tests Development Ideas”. Provided by Bangs Laboratories Inc. 9025 Technology Drive, IN 46038-7034: 3-5.
- Jemo K, et al., (1996) “Immunoassay devices and materials” United States Patent. *Patent No US 5,559,041*.
- Mechaly A., et al., (2008) “Development and Implementation of a Single-Chain Fv antibody for specific detection of *Bacillus anthracis* spores”. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 18-822.
- Nazareth, (2001) “Diagnostic detection device and method”. United States Patent. *Patent No US 6,319,676 B1*.
- Nicholson W.L., et al., (2000) “Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments”. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 548–572.
- Liu C., et al., (2011) “Lateral flow immunochromatographic assay for sensitive pesticide detection by using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle aggregates as color reagents”. *Ana. Chem* 83, 6778–6784.
- Oh W.K., et al., (2011) (2009). “Fluorescent europium-modified polymer nanoparticles for rapid and sensitive anthrax sensors”. *Biosensors & Bioelectronics* 29, 172–177.
- Posthuma-Trumpie G.A., et al., “Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 569–582.
- Skottman T., et al., (2007) “Simultaneous real-time PCR detection of *Bacillus*

anthracis, Francisella tularensis and Yersinia pestis". *Eur. J. Infec Diseases* 26, 207–211.

Garcia-Aljaro C., et al., (2010) "Carbon nanotubes-based chemiresistive biosensors for detection of Microorganisms". *Biosensors & Bioelectronics* 25, 2309–2312.

Slot JW, Geuze HJ (1985) "A new method of preparing gold probes for multiple-

labeling cytochemistry". *Eur. J. Cell. Biol.* 38, 87-93.

Tan C., et al., (2011) "Optical and Electrochemical Responses of an Anthrax Biomarker Based on Single-Walled Carbon Nanotubes Covalently Loaded with Terbium Complexes". *Chemical Communications* 47, 12521–12523.

---

#### NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN TÁCH VÀ XÁC ĐỊNH..... (tiếp theo tr. 13)

#### 4. KẾT LUẬN

Điện di mao quản với detector độ dẫn không tiếp xúc là một phương pháp phân tích mới với độ nhạy và độ chọn lọc tương đối tốt.

Kỹ thuật này cho phép tách và định lượng đồng thời các NTĐH nhóm nhẹ trong dung dịch một cách thuận lợi và thu được kết quả chính xác với độ tin cậy cao. Hy vọng kết quả khả quan này sẽ mở ra hướng nghiên cứu tiếp theo với các NTĐH nhóm nặng, nhằm phát huy vai trò của phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C<sup>4</sup>D) trong lĩnh vực phân tích các nguyên tố đất hiếm.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1.Andreas J. Zemmann, (2001), Conductivity detection in capillary electrophoresis, *Trends in analytical chemistry*, vol. 20, No 6 +7.

2.José A.Gásquez, Edmilson DeLima, Roberto A. Olsina, Luis D. Martinez, Miguel de la Guardia, *Talanta*, 67, 824-828.

3.N.M.P. Moraes, H.M. (1997), Shihomatsu, L.B. Zinner, P. (2005), Miranda Jr, *Journal of Alloys and Compounds* 249, 133- 135.

4.Surendra P.Verma, Roberto Garcia, Edgar Santoyo, Alfredo Aparicio, (2000), *Journal of Chromatography A.* 884 , 317-328.

5.Yanbei Zhu, Akihide Itoh, Eiji Fujimori, Tomonari Umemura, Hiroki Haraguchi, (2006), *Journal of Alloys and Compounds*, 408- 412, 985- 988.