

## NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO TEST THỬ NHANH PHÁT HIỆN TRỰC KHUẨN *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Phạm Đức Minh\*; Lê Quốc Tuấn\*

Nguyễn Hùng Long\*\*; Hoàng Văn Lương\*

### TÓM TẮT

Chẩn đoán bằng que thử nhanh đã và đang chiếm ưu thế trong y học và các lĩnh vực liên quan. Vi khuẩn (VK) *Listeria monocytogenes* là một mầm bệnh nguy hiểm gây ngộ độc thực phẩm và nhiều biến chứng khác. Chẩn đoán nhanh và chính xác VK này có ý nghĩa quan trọng trong điều trị và dự phòng bệnh, cũng như trong việc điều tra, khảo sát tình trạng ô nhiễm thực phẩm. Dựa trên nguyên lý phản ứng miễn dịch kháng nguyên-kháng thể diễn ra trên màng mỏng, Học viện Quân y đã bước đầu chế tạo thành công que thử nhanh phát hiện trực khuẩn *L. monocytogenes*. So với phương pháp nuôi cấy, phương pháp que thử có độ nhạy 89%, độ đặc hiệu 100%. Que thử có khả năng phát hiện được VK ở nồng độ  $10^6$  CFU/ml, giá thành thấp, dễ sử dụng và có khả năng ứng dụng cao trong thực tiễn.

\* Từ khóa: *Listeria monocytogenes*; Que thử nhanh; Nuôi cấy.

## STUDYING DEVELOPMENT OF RAPID TEST TO DETECT *LISTERIA MONOCYTOGENES* BACILLUS

### SUMMARY

*Diagnosis by rapid tests has become a common technique in medical practice as well as in other related works. Listeria monocytogenes bacillus is a dangerous pathogen causing food-borne disease with severe complications. Quick and accurate detection of this bacterium is very essential in treatment and preventive practice, as well as in surveillanucây and investigation of food contaminations. Based on thin-membraned immunochromatography technique on thin membrane, our group in Vietnam Military Medical University has been successfully developed a rapid test (in form of dip-sticks) for detection of L. monocytogenes. Compared to culture technique, rapid test showed sensitivity of 89%, specificity of 100% in detection L. monocytogenes at concentration of  $10^6$  CFU/ml. The test is cheap, easy to handle and highly applicable in general medical practice.*

\* Key words: *Listeria monocytogenes*; Rapid test; Culture.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Bên cạnh những phương pháp chẩn đoán truyền thống, chẩn đoán nhanh bằng que thử nhanh đã và đang chiếm ưu thế trong y học và các lĩnh vực liên quan. Với ưu điểm giá thành thấp, dễ áp dụng, độ chính xác cao, que thử nhanh đang là mục tiêu của nhiều phòng thí nghiệm

cũng như nhiều công ty sản xuất các sản phẩm liên quan đến sinh học phân tử. Học viện Quân y đang quản lý một dây chuyền sản xuất que thử nhanh được nhập từ công ty Arista (Hoa Kỳ), có khả năng hoạt động tự động hoàn toàn hoặc bán tự động.

\* Học viện Quân y

\*\* Bộ Y tế

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Thái Sơn  
TS. Nguyễn Đặng Dũng

VK *Listeria monocytogenes* là một trong nhiều mầm bệnh gây ngộ độc thực phẩm quan trọng, đặc biệt là thức ăn chế biến dùng ngay [5]. Bệnh do *Listeriosis* có thể để lại những hậu quả nghiêm trọng như: gây nhiễm khuẩn huyết, viêm màng não, sảy thai, thai chết lưu và đẻ non ở phụ nữ mang thai..., đặc biệt ở người có hệ miễn dịch suy giảm. Trục khuẩn *L. monocytogenes* là VK gram dương, không sinh nha bào, thường thấy ở đất, nước thải và thực vật, nên dễ dàng nhiễm vào thực phẩm do quá trình chế biến không đảm bảo vệ sinh [6]. VK này có khả năng sinh trưởng, phát triển ở điều kiện nhiệt độ thấp nên vẫn có thể tồn tại và phát triển trong tủ lạnh.

Hiện có một số phương pháp thường dùng để phát hiện *L. monocytogenes* trong thực phẩm gồm: nuôi cấy, phương pháp ELISA; phương pháp khuếch đại gen (PCR)... [1, 2, 3]. Que thử nhanh đã được Singer JM và Plotz CM (1956) [7] nghiên cứu và phát triển. Đến nay, phương pháp dùng que thử nhanh ngày càng có nhiều ưu điểm do dễ áp dụng, giá thành thấp. Từ những yêu cầu đó, chúng tôi nghiên cứu đề tài này nhằm: *Xây dựng quy trình công nghệ chế tạo que thử nhanh phát hiện trực khuẩn L. monocytogenes và bước đầu đánh giá khả năng phát hiện trực khuẩn L. monocytogenes trong thực phẩm.*

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng nghiên cứu.

Nhóm nghiên cứu: VK *L. monocytogenes*.

Nhóm chứng 1: VK thuộc giống *Listeria* (trừ *L. monocytogenes*), gồm: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii subsp. ivanovii*.

Nhóm chứng 2: VK gây nhiễm trùng, nhiễm độc thức ăn (không phải giống *Listeria*), gồm: *S. typhimurium*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella boydii*.

Những VK này đều là chủng chuẩn quốc tế, chủng chuẩn tại các phòng thí nghiệm, được tăng sinh và bảo quản theo tiêu chuẩn quốc gia tại phòng thí nghiệm, Khoa Vi sinh vật, Bệnh viện 103.

Mẫu thực phẩm: 200 mẫu thực phẩm là những sản phẩm có nguồn gốc từ sữa, thịt như sữa tươi, pho mát, xúc xích, patê, được thu thập tại một số cửa hàng thực phẩm, nhà máy chế biến thực phẩm và các hộ gia đình trong thời gian từ 10 - 2010 đến 6 - 2011.

### 2. Vật liệu nghiên cứu.

\* *Dụng cụ, thiết bị*: dụng cụ và thiết bị chuyên dụng của Khoa Vi sinh vật và Trung tâm Nghiên cứu Sinh - Y - Dược học quân sự, Học viện Quân y. Hệ thống sản xuất que thử nhanh của hãng Arista (Hoa Kỳ).

\* *Môi trường nuôi cấy và xác định VK*: nước pepton 0,1%; môi trường thạch Oxford; môi trường thạch Tryptone soya có 0,6% cao men (TSA-YE); canh thang Tryptone soya có 0,6% cao men (TSB-YE); thạch máu cừu; môi trường Clurk-Lubs; canh thang đường Manitol, Xylose, Rhamnose 5%; bộ nhuộm gram.

### \* Kháng thể:

*Bảng 1*: Các kháng thể sử dụng trong nghiên cứu.

| TÊN KHÁNG THỂ                        | VẬT CHỦ | TYP: ISOTOPE | KÍ HIỆU (Catalog#) | HÃNG SẢN XUẤT |
|--------------------------------------|---------|--------------|--------------------|---------------|
| MAb to <i>Listeria monocytogenes</i> | Chuột   | MAb: IgG2    | C86920M            | Biodesign     |
| MAb to <i>Listeria monocytogenes</i> | Chuột   | MAb: IgG1    | C86030M            | Biodesign     |
| Anti mouse IgG                       | Dê      | IgG          | ABCAM-0500         | ABCAM         |

Có 3 kháng thể được gắn lên màng: kháng thể phát hiện (KT1), kháng thể bắt giữ (KT2) và kháng thể kiểm tra (KT3). Kháng thể phát hiện (Detection Antibody) là

C86920M, được gắn với hạt vàng, sau đó gắn lên màng chứa cộng hợp (Conjugate pad). Kháng thể bắt giữ (Capture antibody) là C86030M, được gắn lên màng nuôi cấy ở vị trí đường test. Kháng thể kiểm tra là ABCAM-0500, gắn lên màng nuôi cấy ở vị trí vạch đối chứng (control line).

*\* Màng gắn trên que thử:*

Mỗi thanh test được cấu tạo bởi 5 bộ phận chính: màng hút mẫu (Sample pad); màng chứa chất cộng hợp màu (Conjugate pad); màng nitrocellulose (Nitrocellulose membrane); màng hút trên (Absorbent pad) và đế nhựa giữ (Plastic adhesive backing card) của que thử.

*\* Dung môi xử lý màng:*

Các màng đều có chức năng riêng biệt, trước khi gắn lên test, cần xử lý để tối ưu hóa hoạt động của que thử. Mỗi dung môi đặc hiệu cho một loại màng nhất định và làm tăng hoạt tính của màng sau xử lý.

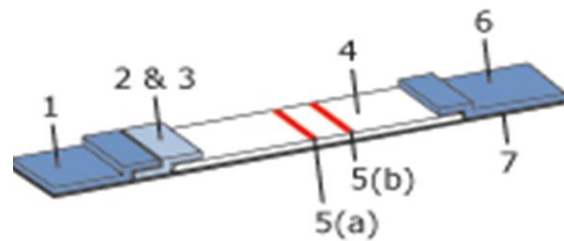
**3. Phương pháp nghiên cứu.**

*\* Phương pháp lấy mẫu:*

Mẫu thực phẩm lấy ngẫu nhiên từ các nhà máy, cơ sở chế biến thực phẩm, cửa hàng thực phẩm hoặc hộ gia đình. Mẫu sau khi lấy, bảo quản ở 4°C đến khi phân tích.

*\* Phương pháp chế tạo que thử nhanh:*

- Thiết kế: dựa theo quy trình của công ty Arista (Hoa Kỳ). Đầu tiên, các loại màng được xử lý bằng dung môi thích hợp, để khô, tiếp theo, phun kháng thể lên màng, cuối cùng, các bộ phận được lắp ghép và giữ chặt trên một đế nhựa. Quá trình tiến hành ở điều kiện nhiệt độ khoảng 25°C, độ ẩm tương đối < 40%. Sau khi hoàn thành, cất giữ sản phẩm trong gói hàn nhiệt kín, có vật liệu chống ẩm bảo quản.



1. Màng hút mẫu.
2. Màng chứa chất cộng hợp màu (chứa KT1).
3. Màng phát hiện đầu tiên.
4. Màng nitrocellulose.
- 5 (a). Vạch phát hiện mẫu (chứa KT2).
- 5 (b). Vạch đối chứng (chứa KT3).
6. Màng hút trên.
7. Đế nhựa giữ.

Hình 1: Sơ đồ cấu tạo của test phát hiện nhanh.

- Nguyên lý hoạt động của que thử: kháng thể phát hiện (KT1) gắn với kháng nguyên đặc hiệu và gặp kháng thể bắt giữ (KT2). Nếu phản ứng miễn dịch đặc hiệu xảy ra, cho kết quả vạch dương tính. Tất cả các phức hợp đi tiếp gặp kháng thể kiểm tra (KT3) sẽ xuất hiện màu tại vạch đối chứng.

- Tối ưu hóa: công đoạn tối ưu hóa sẽ cho công thức phối hợp tối ưu giữa nồng độ kháng thể cũng như hóa chất khác trên que nhúng, sao cho đảm bảo nguyên tắc “sử dụng hàm lượng tối thiểu các chất để tạo được thiết bị có tính năng tối ưu”.

*\* Phương pháp vi sinh vật học:*

Phân lập và định danh VK *L. monocytogenes* theo tiêu chuẩn Ngành Y tế của Hội Khoa học - Kỹ thuật An toàn thực phẩm, nhóm TQTP 52 TCN-TQTP 0002:2003 có hiệu lực từ ngày 25/3/2003-Bộ Y tế.

*\* Phương pháp thử nghiệm que nhúng với mẫu thử:*

Que nhúng được thử nghiệm với các mẫu VK chủng chuẩn để xác định độ nhạy và độ đặc hiệu, đồng thời thử với các mẫu

thực phẩm để có thể so sánh với phương pháp nuôi cấy về giá trị phát hiện.

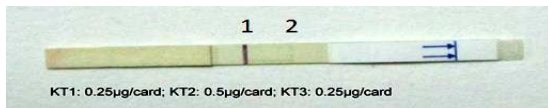
\* *Địa điểm nghiên cứu:* Labo Vi sinh và các mầm bệnh sinh học, Trung tâm Nghiên cứu Sinh - Y - Dược học quân sự, Học viện Quân y và Khoa Vi sinh vật, Bệnh viện 103.

\* *Xử lý số liệu:* quản lý và phân tích số liệu bằng phần mềm SPSS 16.0.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 1. Chế tạo và tối ưu hóa que nhúng.

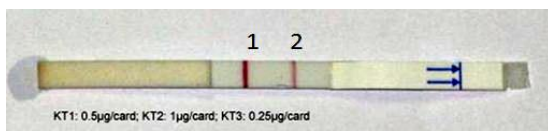
\* *Nồng độ kháng thể trên màng que thử:*



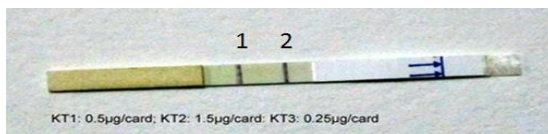
Hình 2: Que thử có hàm lượng KT1: 0,25 µg/card; KT2: 0,5 µg/card; KT3: 0,25 µg/card.



Hình 3: Que thử có hàm lượng KT1: 0,5 µg/card; KT2: 0,5 µg/card; KT3: 0,25 µg/card.



Hình 4: Que thử có hàm lượng KT1: 0,5 µg/card; KT2: 1 µg/card; KT3: 0,25 µg/card.

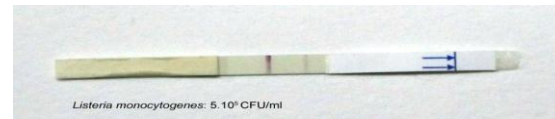


Hình 5: Que thử có hàm lượng KT1: 0,5 µg/card; KT2: 1,5 µg/card; KT3: 0,25 µg/card.

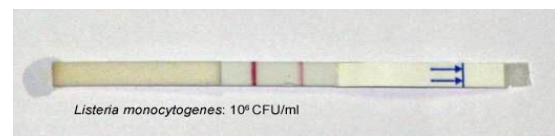
(Vị trí 1: vạch chứng; vị trí 2: vạch test)

Que thử có hàm lượng KT1: 0,5 µg/card; KT2: 0,5 µg/card; KT3: 0,25 µg/card cho tín hiệu có thể nhận biết được.

\* *Khả năng phát hiện của que thử trên mẫu VK:*



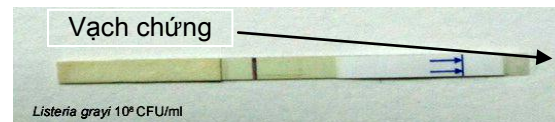
Hình 6: Thử que nhúng với VK *L. monocytogenes* ở nồng độ  $5.10^5$  CFU/ml.



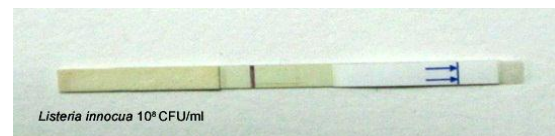
Hình 7: Thử que nhúng với VK *L. monocytogenes* ở nồng độ  $10^6$  CFU/ml.

Que thử cho kết quả dương tính (2 vạch) rõ nét với VK *L. monocytogenes* ở nồng độ  $10^6$  CFU/ml.

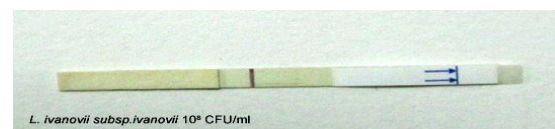
### 2. Tính đặc hiệu của que thử



Hình 8: Thử que nhúng với VK *L. grayi*.



Hình 9: Thử que nhúng với VK *L. innocua*.



Hình 10: Thử que nhúng với VK *L. ivanovii subsp. ivanovii*.

Que thử cho kết quả âm tính (tín hiệu tại vạch chứng) với VK *L. grayi* và *L. innocua*.

Tương tự, các thí nghiệm que thử nhanh với VK *Vibrio cholera*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* đều cho kết quả âm tính.

### 3. Đánh giá tính năng que thử nhanh trên mẫu thực phẩm.

**Bảng 2:** Kết quả thử nghiệm que thử nhanh trên thực phẩm so với nuôi cấy.

| QUE THỬ NHANH   | KẾT QUẢ | NUÔI CẤY |     | TỔNG |
|---|---------|----------|-----|------|
|   |         | (+)      | (-) |      |
|   | (+)     | 16       | 0   | 16   |
|   | (-)     | 2        | 182 | 184  |
| Tổng  |         | 18       | 182 | 200  |
| Kappa = 0,93; Se = 89%; Sp = 100%;<br>PPV = 100%; NPV = 99% |         |          |     |      |

## BÀN LUẬN

### 1. Quy trình chế tạo que thử nhanh.

Kết quả khảo nghiệm cho thấy, khi nồng độ kháng thể tại màng cộng hợp và màng NC < 0,5 µg/card, tín hiệu tại que thử không có hoặc yếu. Tín hiệu rõ khi hàm lượng kháng thể > 0,5 µg/card và rất rõ khi > 1 µg/card.

Trong sản xuất que thử, cần quan tâm đến giá thành sản phẩm, cần sử dụng lượng nguyên liệu tối thiểu để đưa ra được sản phẩm đạt yêu cầu. Vì thế, công thức phối hợp tối ưu về hàm lượng kháng thể tại màng cộng hợp (KT1), vạch kiểm tra (KT2), vạch đối chứng (KT3) lần lượt là: 0,5; 1; 0,25 µg/card.

Trong tương lai, có thể nghiên cứu dùng kháng thể polyclonal thay thế cho monoclonal nhằm tăng ngưỡng phát hiện và giảm chi phí tạo kit.

Độ ẩm khi phun kháng thể là một trong những yêu cầu rất quan trọng, nếu độ ẩm

cao > 45% sẽ dẫn đến nhòe vạch phun, kháng thể bám dính vào màng lai không tốt, độ ổn định của que thử không cao.

### 2. Khả năng phát hiện của que thử nhanh với trực khuẩn *L. monocytogenes*.

Que thử nhanh sau khi tối ưu được thử với VK *L. monocytogenes* chủng chuẩn ở những nồng độ khác nhau. Kết quả cho thấy, tín hiệu của que thử có thể phát hiện được bằng mắt thường khi nồng độ VK trong mẫu thử là  $10^6$  CFU/ml.

Kết quả so sánh chẩn đoán giữa hai phương pháp que thử nhanh và nuôi cấy đối với một số mẫu thực phẩm cho thấy: phương pháp que thử nhanh có độ nhạy 89%, độ đặc hiệu 100%. Hệ số Kappa của hai phương pháp là 0,93, nên có thể dùng hỗ trợ và thay thế lẫn nhau. Giá trị chẩn đoán của phương pháp nuôi cấy rất cao, thường được coi là chuẩn vàng, tuy nhiên, nuôi cấy cần thời gian tối thiểu 3 - 5 ngày, với nhiều trang thiết bị, dụng cụ, môi trường, tủ nuôi, kỹ thuật viên lành nghề, chi phí cao hơn nhiều so với phương pháp que thử nhanh.

Que thử nhanh cho kết quả trong vòng 5 - 10 phút. Chính vì vậy, trên thực tế que thử nhanh giúp ích trong công tác sàng lọc nhanh các mẫu thực phẩm nhiễm mầm bệnh trước khi tiến hành xét nghiệm sâu hơn, giúp giảm chi phí trong xét nghiệm chẩn đoán. Khi áp dụng phương pháp này cùng với các phương pháp khuếch đại gen, đặc biệt là khuếch đại gen định lượng, các nhà khoa học có thể trả lời nhanh và chính xác về chủng loại và số lượng mầm bệnh bị nhiễm trong thực phẩm [4].

## KẾT LUẬN

Đã chế tạo thành công que thử nhanh phát hiện trực khuẩn *L. monocytogenes*. Que thử

có khả năng phát hiện được VK ở nồng độ  $10^6$  CFU/ml, độ đặc hiệu tuyệt đối.

So với phương pháp nuôi cấy trong phát hiện trực khuẩn *L. monocytogenes*, phương pháp que nhúng có độ đặc hiệu 100%, độ nhạy 89%, hệ số phù hợp Kappa = 0,93.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Chi Phương. An toàn thực phẩm: nhiễm khuẩn *Listeria*. Tạp chí Y học dự phòng. 2005, số 6, tr.97-99.

2. Nguyễn Minh Thực và CS. Bước đầu khảo sát sự nhiễm *L. monocytogenes* trong một số thực phẩm trên thị trường Hà Nội bằng kỹ thuật PCR. Tạp chí Khoa học và Công nghệ. 2008, tập 46, số 2, tr.67-77.

3. Nguyễn Thị Kim Hoa và CS. Ứng dụng kỹ thuật PCR trong phát hiện nhanh *L. monocytogenes*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ. 2005, tập 43, số 4, tr.37-45.

4. Angela Ingianni et al. Isolation and identification of *L. monocytogenes* in processed meat by a combined cultural-molecular method. American Journal of Infectious Diseases. 2007, 3 (3), pp.159-164.

5. Daniel L Gallagher et al. FSIS risk assessment for *L. monocytogenes* in deli meats. [www.fsis.usda.gov/oppde/rdad/FRPubs/97-013F/ListeriaReport.pdf](http://www.fsis.usda.gov/oppde/rdad/FRPubs/97-013F/ListeriaReport.pdf). 2003.

6. Murray EGD, Webb RE, Swann MBR. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). J Pathol Bacteriol. 1926, 29, pp.407-439.

7. Singer JM, Plotz CM. The latex fixation test. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. American Journal of Medicine. 1956, 21, pp.888-892.

