

PHÁT TRIỂN QUE THỬ PHÁT HIỆN BÀO TỬ BACILLUS ANTHRACIS THEO NGUYÊN LÝ KẾT TỤ MIỄN DỊCH

Đến tòa soạn 31-08-2022

Bùi Nguyên Hải¹, Nguyễn Thị Nga¹, Nguyễn Thị Thu Hoài¹, Trần Trọng Hội¹, Trần Thị Hạnh¹, Nguyễn Thị Thanh Hương², Trần Đăng Minh², Hoàng Tuấn Minh², Lê Quang Hòa^{*2}

1. Viện Khoa học và Công nghệ, Bộ Công an

2. Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội

Email: hoa.lequang@hust.edu.vn

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A DIPSTICK TEST BASED ON IMMUNOLOGICAL AGGLUTINATION FOR THE DETECTION OF BACILLUS ANTHRACIS SPORES

Bacillus anthracis represents a serious threat of biological weapons, and there is an urgent need to develop a rapid, simple and sensitive assay to detect *B. anthracis* spores in environmental samples. Commercial lateral flow immunoassays for detection of *B. anthracis* spores are easy to perform but exhibit very low sensitivity. This study aims to develop a sensitive and simple dipstick test, based on agglutination reaction between *B. anthracis* spores and antibody-coated magnetic particles, to detect spores of this pathogen. To this aim, factors affecting the test performance including antibody, nitrocellulose membrane type, incubation time and pH of reaction between detection conjugate and sample, and concentration of Tween-20 were optimized. Under the optimal condition (monoclonal antibody to Anthrax Spore Specific 23A-14G9, UniSart® CN95 nitrocellulose membrane, 30 minutes of incubation, pH 9.0, and 1% Tween-20), the developed test could detect *B. anthracis* spores with the limit of detection of 6×10^4 spores/mL, and showed no cross-reactivity to *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. clausii*, *Yersinia bercovier* và *Yersinia rohdei* and *E. coli*. When applied to detect *B. anthracis* spores in simulated starch samples, the developed assay has a detection limit of 10^7 spores/g starch. This new immunoassay is particularly suitable for screening of *B. anthracis* spores in powdery samples because of its simplicity and improved sensitivity.

Keywords: agglutination, anthrax, *Bacillus anthracis*, rapid test, Road Closure, spore

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tác nhân gây bệnh than, *Bacillus anthracis*, là vi khuẩn Gram dương, hình que, hiếu khí và có khả năng tạo bào tử. Bào tử của *B. anthracis* có thể tồn tại bền bỉ trong các môi trường khắc nghiệt [1]. Trong tự nhiên, dịch than thường bùng phát trên các quần thể động vật, gia súc. Hàng năm cũng có khoảng 2000 trường hợp mắc bệnh than ở người được ghi nhận trên toàn thế giới. Ngoài ra, do tính nguy hiểm và việc dễ dàng tạo bào tử của *B. anthracis* mà tác

nhân này có thể được sử dụng làm vũ khí sinh học. Ví dụ điển hình là các vụ khủng bố bằng thư chứa bào tử của *B. anthracis* tại Mỹ trong năm 2001 đã khiến 5 ca tử vong. Ngoài vấn đề ảnh hưởng trực tiếp đến tính mạng con người, các vụ khủng bố này còn gây nên nỗi lo sợ cho toàn xã hội Mỹ trong khoảng thời gian dài sau đó.

Hiện nay, một số hệ thống real-time PCR cầm tay trên thị trường cho phép phát hiện *B. anthracis* ngay tại hiện trường với độ nhạy và

độ đặc hiệu cao [2]. Tuy nhiên, nhược điểm của các hệ thống này là giá thành thiết bị và sinh phẩm rất cao, hạn chế khả năng áp dụng rộng rãi. Vì vậy, để giải quyết nhu cầu phát hiện nhanh *B. anthracis* ngay tại hiện trường, một số sinh phẩm dựa trên kỹ thuật sắc ký miễn dịch đã được phát triển như BioThreat Alert (Tetracore), BADD (AdVnt Biotechnologies), SMART II (New Horizons Diagnostics), miPROTECT (Miprolab) [3]. Tuy nhiên, ngưỡng phát hiện của các que thử này rất cao, dao động trong khoảng từ $2,3 \times 10^7$ đến $4,2 \times 10^9$ bào tử/mL [3]. Điều này có thể gây ra hiện tượng âm tính giả, hết sức nguy hiểm trong hoạt động phòng chống khủng bố. Để nâng cao độ nhạy phân tích của que thử phát hiện bào tử *B. anthracis*, Wang và đồng tác giả đã phát triển một cấu hình que thử mới, được đặt tên là “Road closure” trong đó một kháng thể đơn dòng đặc hiệu được gắn lên bi từ để phản ứng với bào tử và gây ra hiện tượng kết tụ bi [4]. Phức hợp kết tụ này sẽ không dịch chuyển lên trên que thử mà sẽ tạo thành một vạch tín hiệu có thể quan sát được bằng mắt thường ở ngay đầu que thử được gọi là “Retention line”. Mục tiêu của nghiên cứu này là ứng dụng nguyên lý “Road closure” và kháng thể thương mại để phát triển que thử phát hiện nhanh bào tử *B. anthracis* với độ nhạy cao.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Vật liệu

Các chủng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm: chủng *B. anthracis* Sterne 34F2 từ vắc xin vô độc nhiệt than (VETVACO), chủng *B. thuringiensis* ATCC 10792, chủng *B. subtilis subsp. subtilis* 168 ATCC 23857, chủng *B. cereus* ATCC 10876, *B. clausii* từ men tiêu hóa Enterogermina (Sanofi aventis), chủng *E. coli* DH5alpha, *Yersinia bercovier* ATCC 43970 và *Yersinia rohdei* ATCC 43380. Trong đó, chủng *B. anthracis* Sterne 34F2 đã được loại bỏ plasmid pXO2 và không còn khả năng gây bệnh. Các hóa chất chính được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: kháng thể đa dòng anti-*B. anthracis* từ dê (Tetracore), kháng thể đơn dòng anti-*B.*

anthracis 8G4 (Tetracore), kháng thể đơn dòng đặc hiệu bào tử *B. anthracis* 23A-14G9 (Tetracore), kháng thể đa dòng kháng IgG chuột mã hiệu M5899 (Sigma), kháng thể đa dòng kháng IgG dê mã hiệu G4018 (Sigma), bi từ Carboxyl-Adembeads đường kính 300 nm (Ademtech). Các hóa chất thông thường khác có nguồn gốc từ Sigma và Thermo Fisher Scientific.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp tạo bào tử

Bào tử của *B. anthracis* Sterne 34F2, *B. thuringiensis* ATCC 10792, *B. cereus* ATCC 10876 và *B. subtilis subsp. subtilis* 168 ATCC 23857 được tạo theo quy trình của Wang và đồng tác giả [4]. Bào tử được tinh sạch bằng phương ly tâm gradient sucrose theo Weldy và đồng tác giả [5]. Mật độ bào tử được xác định bằng phương pháp cấy trải trên đĩa thạch LB.

2.2.2. Phương pháp tạo cộng hợp phát hiện giữa kháng thể và bi từ Carboxyl-Adembeads

Cộng hợp phát hiện giữa kháng thể và bi từ được chế tạo theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cộng hợp phát hiện được bảo quản ở nồng độ 5 mg bi/mL ở 4°C.

2.2.3. Phương pháp in phun que thử

Quá trình in phun vạch kiểm chứng được thực hiện bằng thiết bị Linomat 5 (CAMAG). Kháng thể đa dòng kháng IgG chuột M5899 (Sigma) và kháng thể đa dòng kháng IgG dê G4018 (Sigma) được in phun với nồng độ 2 $\mu\text{g}/\text{cm}$ tại vị trí cách mép dưới que thử 1,5 cm. Sau đó, màng được sấy ở 37°C trong 1 giờ và được cắt thành các que thử có độ rộng 4 mm bằng AUTOKUN Cutter. Ba loại màng được thử nghiệm là UniSart® CN95 (Sartorius), UniSart® CN140 (Sartorius) và CNPC-SS12 10 μm (MDI technologies).

2.2.4. Phương pháp phát hiện bào tử *B. anthracis* bằng que thử “Road Closure”

Bào tử *B. anthracis* được phát hiện bằng que thử “Road closure” theo nguyên lý được trình bày ở Hình 1. Mẫu phân tích được trộn với 3 μL cộng hợp phát hiện trong 500 μL đệm Borat 50 mM pH 8,5-9,5 chứa 1% BSA và ủ lắc 15-60 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, giá từ được sử dụng để loại bỏ dịch và thu cộng hợp

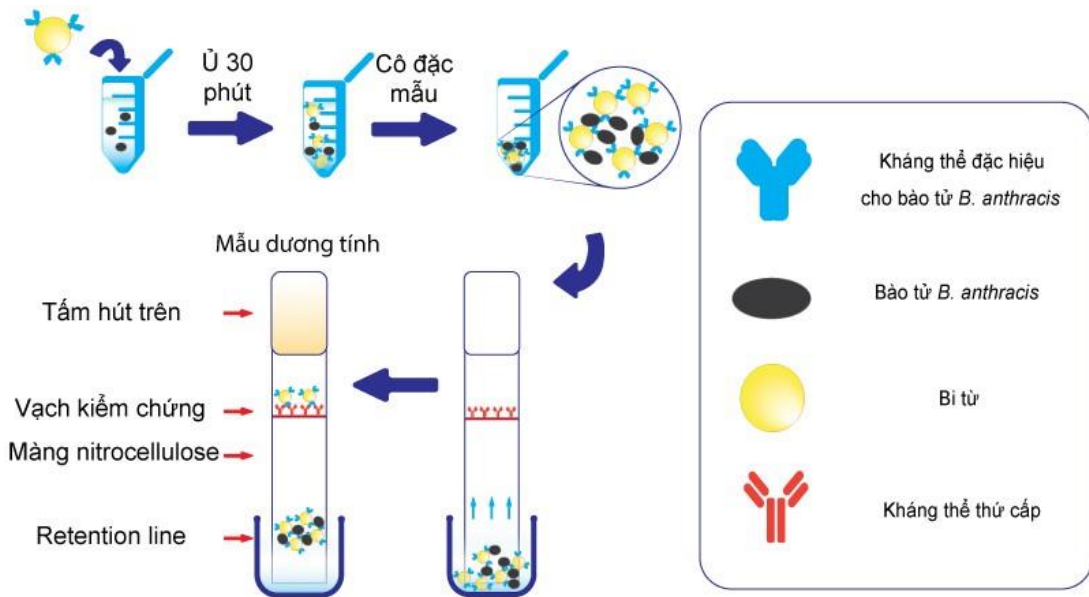
phát hiện. Tiếp đó, 50 μ L PBS pH 7,5 chứa 0,5-1,5% Tween-20 được bổ sung để hòa tan cộng hợp. Que thử được cắm vào các giếng để phân tích phản ứng kết tụ. Quy trình phân tích que thử “Road closure” được tối ưu bằng cách thay đổi các thông số như loại màng nitrocellulose, pH và thời gian ủ của phản ứng của cộng hợp phát hiện với bào tử, nồng độ Tween-20.

Đối với mẫu dương tính, bào tử và cộng hợp phát hiện sẽ liên kết chéo tạo thành một mạng lưới có kích thước không gian lớn do vậy không di chuyển được lên trên màng nitrocellulose (Hình 1). Khi cắm que thử vào mẫu phân tích, phức hợp trên sẽ kết tụ tại vị trí tiếp xúc giữa que thử và bề mặt dung dịch tạo thành vạch “Retention” có khả năng quan sát được bằng mắt thường. Các cộng hợp phát hiện ở trạng thái tự do sẽ di chuyển lên trên que thử và phản ứng với kháng thể vạch kiểm chứng và cho tín hiệu màu tại đây. Đối với mẫu âm tính,

toàn bộ cộng hợp phát hiện ở trạng thái tự do sẽ di chuyển lên trên màng nitrocellulose đến vị trí vạch kiểm chứng và tạo tín hiệu tại đây.

Đối với mẫu bột giả nhiễm, 10 mg tinh bột đã được nhiễm chủ động bào tử hoặc tế bào sinh dưỡng được cân vào một ống eppendorf 1,5 mL. Sau đó, 1 mL dung dịch đệm Borat 50 mM pH 9,0 được bổ sung vào ống, đảo trộn mạnh trong 30 giây và được để lắng 10 phút. Tiếp đó, 500 μ L dịch nổi được chuyển vào ống eppendorf mới chứa 3 μ L cộng hợp phát hiện và lắc ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Các bước phân tích tiếp theo của que thử được tiến hành tương tự như ở trên.

Hình ảnh các que thử được scan bằng máy EPSON V800. Sau đó, cường độ màu vạch “Retention” được định lượng bằng phần mềm ImageJ.



Hình 1. Nguyên lý kết tụ của que thử “Road closure” phát hiện bào tử *B. anthracis*

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

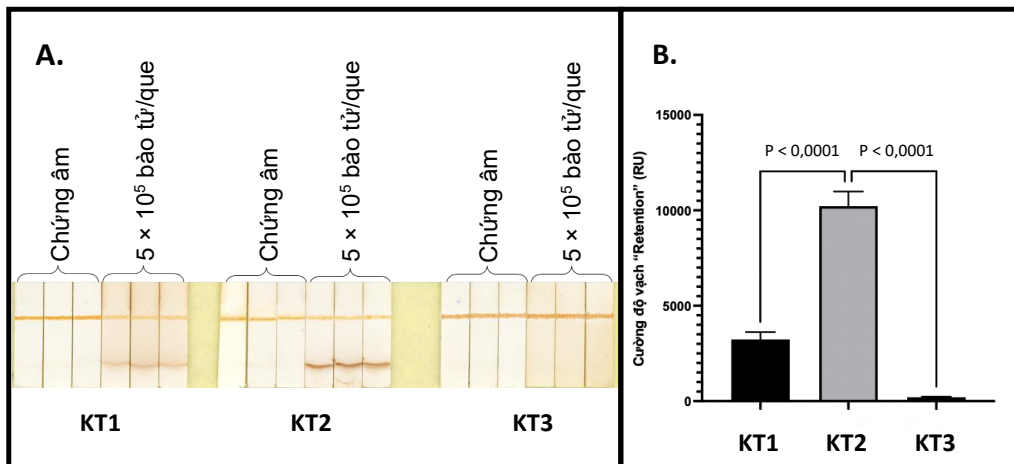
a) Kết quả lựa chọn kháng thể tạo cộng hợp phát hiện bào tử *B. anthracis* theo nguyên lý “Road closure”.

Khác với que thử sắc ký miễn dịch thông thường, thay vì phải sử dụng hai kháng thể (một kháng thể tóm bắt và một kháng thể phát

hiện) thì đối với que thử “Road closure” theo nguyên lý kết tụ chỉ cần sử dụng một kháng thể là đã có thể phát hiện được bào tử *B. anthracis*. Do vậy, độ chính xác của que thử “Road closure” phụ thuộc rất nhiều vào đặc tính của kháng thể tạo cộng hợp phát hiện. Trong nghiên cứu này, ba kháng thể thương mại từ

hãng Tetracore đã được thử nghiệm để tạo cộng hợp với bi từ là: (i) kháng thể đa dòng anti-*B. anthracis* từ dê, (ii) kháng thể đơn dòng đặc hiệu bào tử *B. anthracis* 23A-14G9 và (iii) kháng thể đơn dòng anti-*B. anthracis* 8G4. Kết quả thử nghiệm (Hình 2) cho thấy, ở nồng độ 5×10^5 bào tử/que, các kháng thể đa dòng anti-*B. anthracis* từ dê và kháng thể đơn dòng đặc hiệu bào tử *B. anthracis* 23A-14G9 cho vạch “Retention” rõ ràng có thể quan sát bằng mắt thường. Trong khi đó, ở kháng thể đơn dòng anti-*B. anthracis* 8G4 không thấy xuất hiện vạch “Retention”. Ở các mẫu âm tính của ba loại kháng thể được thử nghiệm đều không xuất hiện vạch “Retention”. Điều này cho thấy sự xuất hiện của vạch “Retention” trên các que

thử sử dụng hai loại kháng thể đa dòng anti-*B. anthracis* từ dê và kháng thể đơn dòng đặc hiệu bào tử *B. anthracis* 23A-14G9 là liên quan đến sự hiện diện của bào tử *B. anthracis*. Bên cạnh đó trên toàn bộ các que thử đều xuất hiện vạch kiểm chứng rõ ràng có thể quan sát bằng mắt thường. Khi so sánh về cường độ tín hiệu vạch “Retention” giữa các mẫu dương của que thử (Hình 2), kháng thể đơn dòng đặc hiệu bào tử *B. anthracis* 23A-14G9 cho tín hiệu gấp khoảng ba lần so với kháng thể đa dòng anti-*B. anthracis* từ dê. Từ các kết quả này, để nâng cao độ nhạy phát hiện của que thử, kháng thể đơn dòng đặc hiệu bào tử *B. anthracis* 23A-14G9 được lựa chọn để tạo cộng hợp phát hiện cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 2. Kết quả lựa chọn kháng thể tạo cộng hợp phát hiện bào tử *B. anthracis*. Ba kháng thể được thử nghiệm là kháng thể đa dòng anti-*B. anthracis* từ dê (KT1), kháng thể đơn dòng đặc hiệu bào tử *B. anthracis* 23A-14G9 (KT2) và kháng thể đơn dòng anti-*B. anthracis* 8G4 (KT3)

A. Hình ảnh quét các que thử. Mỗi thí nghiệm được lặp ba lần.

B. Cường độ tín hiệu vạch “Retention”.

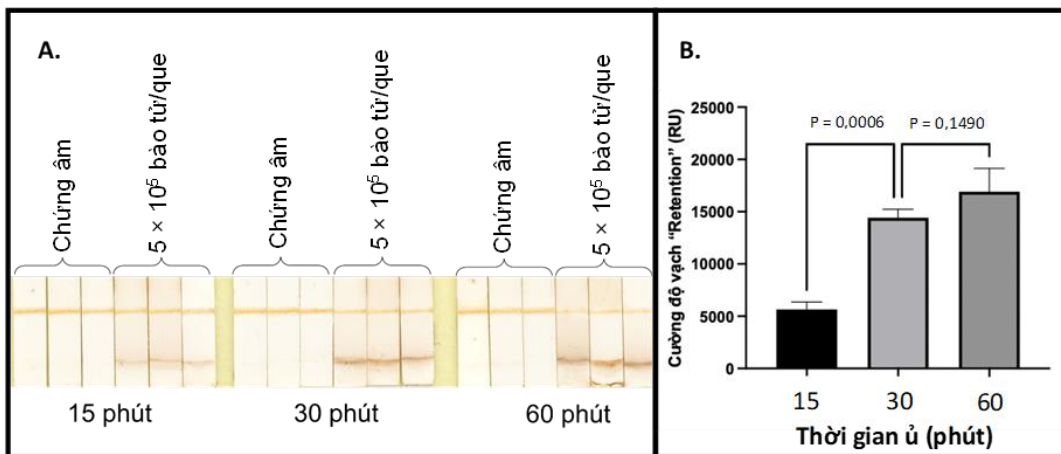
3.2. Tối ưu các thông số của quy trình phát hiện bào tử *B. anthracis* bằng que thử “Road closure”

Trong nghiên cứu mở đường của Wang và đồng tác giả, loại bi từ có kích thước 300 nm (Ademtech) cho độ nhạy phát hiện tốt nhất [4]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, loại bi từ trên đã được sử dụng để tạo cộng hợp phát hiện với kháng thể đơn dòng đặc hiệu bào tử *B. anthracis* 23A-14G9. Các thông số khác của quy trình phát hiện bào tử *B. anthracis* bằng

que thử “Road closure” đã được tối ưu hóa bao gồm: (i) loại màng nitrocellulose (UniSart® CN95, UniSart® CN140, CNPC-SS12 10 µm); (ii) pH của phản ứng giữa cộng hợp phát hiện với bào tử (8,5; 9,0; 9,5); (iii) thời gian ủ của phản ứng giữa cộng hợp phát hiện với bào tử (15 phút, 30 phút, 60 phút); (iv) nồng độ Tween-20 (0,5 %, 1 %, 1,5 %). Kết quả thử nghiệm cho thấy, điều kiện tối ưu của quy trình phát hiện bào tử *B. anthracis* bằng que thử “Road closure” là sử dụng màng UniSart®

CN95; với pH của đệm phản ứng Borat 50 mM là 9,0; nồng độ Tween-20 là 1 % (kết quả không được trình bày). Kết quả tối ưu thời gian ủ phản ứng của cộng hợp phát hiện với bào tử (Hình 3) cho thấy thời gian ủ càng dài sẽ cho vạch “Retention” càng đậm. Tuy nhiên, giữa các khoảng thời gian ủ là 30 phút và 60 phút, cường độ tín hiệu vạch “Retention” không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,149$). Do vậy, thời gian ủ 30 phút được lựa chọn là thời gian ủ tối ưu cho phản ứng giữa cộng hợp

phát hiện với bào tử. So sánh với các nghiên cứu đã được công bố cho thấy có một số sự khác biệt về điều kiện tối ưu của quy trình phân tích như sau: thời gian ủ là 10 phút; pH 9,5; nồng độ Tween-20 là 0,5 % trong nghiên cứu của Wang và đồng tác giả [4]; trong khi đó, thời gian ủ là 30 phút; pH 9,0; nồng độ Tween-20 là 1 % trong nghiên cứu của chúng tôi. Các khác biệt này có thể là do các kháng thể đơn dòng được sử dụng trong hai nghiên cứu là khác nhau.



Hình 3. Kết quả tối ưu thời gian ủ cộng hợp phát hiện và bào tử *B. anthracis*.

A. Hình ảnh quét các que thử. Mỗi thí nghiệm được lập ba lần.

B. Cường độ tín hiệu vạch “Retention”

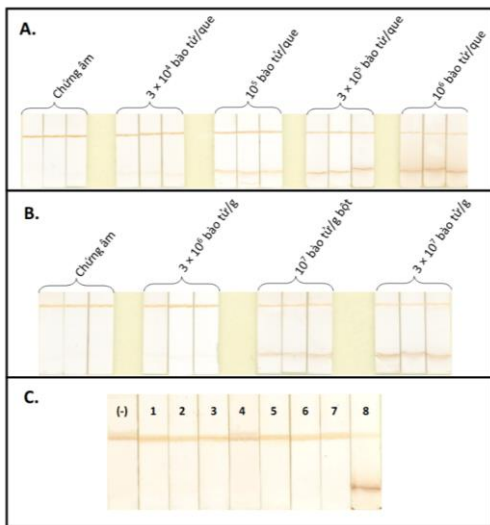
3.3. Ngưỡng phát hiện và phản ứng chéo của que thử “Road closure”

Bào tử *B. anthracis* được pha loãng tới các nồng độ khác nhau nhằm xác định ngưỡng phát hiện của que thử. Kết quả phân tích (Hình 4A) cho thấy ở nồng độ 3×10^4 bào tử/que vẫn có thể quan sát được tín hiệu ở vạch “Retention” mặc dù khá mờ. Do vậy, có thể kết luận sơ bộ ngưỡng phát hiện của que thử đối với bào tử *B. anthracis* là 3×10^4 bào tử/que hoặc 6×10^4 bào tử/mL đệm. Khi so sánh với ngưỡng phát hiện của các que thử sắc ký miễn dịch thương mại như BioThreat Alert ($2,3 \times 10^9$ bào tử/mL), BADD™ AdVnt ($2,3 \times 10^7$ bào tử/mL), SMART II™ ($2,3 \times 10^7$ bào tử/mL), miPROTECT ($> 4,2 \times 10^9$ bào tử/mL), ngưỡng phát hiện của que thử “Road closure” phát triển trong nghiên cứu này là thấp hơn ít nhất

là 300 lần [3]. Điều này phần lớn là do khả năng cô đặc mẫu khi sử dụng cộng hợp phát hiện bị từ gắn kháng thể. Tuy nhiên, khi so sánh với nghiên cứu mở đường của Wang và đồng tác giả [4], ngưỡng phát hiện của que thử được phát triển trong nghiên cứu này vẫn cao hơn khoảng 10 lần (6×10^4 bào tử/mL so với $5 - 7 \times 10^3$ bào tử/mL). Độ nhạy cao của que thử trong nghiên cứu của Wang và đồng tác giả là nhờ việc sử dụng thiết bị đo tín hiệu từ tính chuyên dụng, trong khi nghiên cứu của chúng tôi phát hiện tín hiệu vạch “Retention” bằng mắt thường [4].

Đối với mẫu tinh bột giả nhiễm, kết quả phân tích (Hình 4B) cho thấy ở nồng độ 10^7 bào tử/g cho vạch “Retention” có thể quan sát được rõ ràng bằng mắt thường. Ở mẫu bột giả nhiễm *B. anthracis* có nồng độ 3×10^6 bào tử/g không

có tín hiệu tại vạch “Retention”. Kết quả này cho thấy ngưỡng phát hiện của que thử đối với mẫu tinh bột giả nhiễm là khoảng 10^7 bào tử/g. Phản ứng chéo của que thử với các tác nhân vi khuẩn khác đã được đánh giá bằng cách sử dụng bào tử của *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. clausii* ở mật độ 10^7 bào tử/mL và tế bào sinh dưỡng *Y. rohdei*, *Y. bercovieri*, *E. coli* ở mật độ 10^7 CFU/mL. Kết quả thử nghiệm (Hình 4C) cho thấy que thử không có phản ứng chéo với toàn bộ các tác nhân đã được thử nghiệm. Điều này cho thấy kháng thể đơn dòng 23A-14G9 là có tính đặc hiệu cao đối với bào tử *B. anthracis*.



Hình 4. Ngưỡng phát hiện bào tử *B. anthracis* và phản ứng chéo của que thử “Road closure”

A. Ngưỡng phát hiện trong đệm borat

B. Ngưỡng phát hiện trong mẫu bột giả nhiễm.

C. Phản ứng chéo của que thử với các tác nhân vi khuẩn.

(-): Mẫu kiểm chứng âm; 1: bào tử *B.*

thuringiensis; 2: bào tử *B. cereus*; 3: bào tử *B.*

subtilis; 4: bào tử *B. clausii*; 5: tế bào *E. coli*;

6: tế bào *Y. bercovier*; 7: tế bào *Y. rohdei*; 8:

Kiểm chứng dương.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã phát triển được que thử phát hiện bào tử *B. anthracis* dựa trên nguyên

lý “Road closure” với các thông số được tối ưu là: cộng hợp phát hiện được chế tạo từ bi từ Carboxyl-Adembeads đường kính 300 nm và kháng thể đơn dòng đặc hiệu bào tử *B. anthracis* 23A-14G9; màng chế tạo que thử là UniSart® CN95; pH của đệm phản ứng giữa cộng hợp phát hiện với bào tử là 9,0; thời gian ủ của phản ứng giữa cộng hợp phát hiện với bào tử là 30 phút; nồng độ Tween-20 là 1 %. Que thử tạo ra có ngưỡng phát hiện bào tử *B. anthracis* là 3×10^4 bào tử/que hoặc 6×10^4 bào tử/mL đệm borat và không có phản ứng chéo với bào tử của *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. clausii*, *E. coli*, *Y. bercovier* và *Y. rohdei*. Que thử này có thể phát hiện được bào tử *B. anthracis* trong mẫu tinh bột giả nhiễm với ngưỡng phát hiện là 10^7 bào tử/g bột.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Spencer RC. Bacillus anthracis. J Clin Pathol. 2003 Mar;56(3):182-7.
2. Zasada AA. Detection and Identification of Bacillus anthracis: From Conventional to Molecular Microbiology Methods. Microorganisms. 2020 Jan 16;8(1):125.
3. Ziegler I, Vollmar P, Knüpfer M, Braun P, Stoecker K. Reevaluating limits of detection of 12 lateral flow immunoassays for the detection of Yersinia pestis, Francisella tularensis, and Bacillus anthracis spores using viable risk group-3 strains. J Appl Microbiol. 2021 Apr;130(4):1173-1180.
4. Wang DB, Tian B, Zhang ZP, Wang XY, Fleming J, et al. (2015). Detection of Bacillus anthracis spores by super-paramagnetic lateral-flow immunoassays based on “Road Closure.” Biosensors and Bioelectronics, 67, 608–614.
5. Weldy M, Evert C, Dosa PI, Khoruts A, Sadowsky MJ. Convenient Protocol for Production and Purification of Clostridioides difficile Spores for Germination Studies. STAR Protoc. 2020 Jul 24;1(2):100071.