

DEVELOPMENT OF A LATERAL FLOW IMMUNOCHROMATOGRAPHY TEST STRIP FOR RAPID DETECTION OF CHOLERA TOXIN

To Lan Anh, Tran Thi Thanh Quynh, Dang Phuong Nam, Dinh Thi Hoa,
Vu Ngoc Toan, Nguyen Thi Xuan, Nguyen Minh Tri, Nguyen Khanh Hoang Viet*
Institute of New Technology - Academy of Military Science and Technology

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 02/01/2024 Revised: 29/01/2024 Published: 31/01/2024	Cholera toxin produced by <i>Vibrio cholerae</i> is one of the most common waterborne pathogens responsible for dysentery, especially in developing countries. Therefore, it is necessary to detect CT rapidly to control the quality of water and diagnose the disease caused by this pathogen. In this study, the test strip for CT rapid detection has been successfully developed based on immunochromatographic techniques. The concentration of antibodies on the control line and the test line were 1.3 µg/cm and 4 µg/cm, respectively. The suspension of gold nanoparticles 15±2 nm, OD ₅₂₀ =1 was prepared for conjugating with the capture antibody at a concentration of 200 µg/mL, pH 9. The resulted test strip enabled the detection of CT at 10 ng/mL within 10 min. The sensitivity and specificity of the test strip were 96.67% and 100%, respectively. These results are initial steps for developing biological kits to quickly detect pathogens in water and food.
KEYWORDS Foodborne pathogens Cholera toxin <i>Vibrio cholerae</i> Immunochromatography Rapid lateral flow test strips	

NGHIÊN CỨU TỐI ƯU QUY TRÌNH CHẾ TẠO QUE THỬ PHÁT HIỆN NHANH ĐỘC TỔ CHOLERA BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ MIỄN DỊCH

Tô Lan Anh, Trần Thị Thanh Quỳnh, Đặng Phương Nam, Đinh Thị Hoa,
Vũ Ngọc Toán, Nguyễn Thị Xuân, Nguyễn Minh Trí, Nguyễn Khánh Hoàng Việt*
Viện Công nghệ mới - Viện Khoa học và Công nghệ quân sự

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 02/01/2024 Ngày hoàn thiện: 29/01/2024 Ngày đăng: 31/01/2024	Độc tố cholera (CT) sinh tổng hợp bởi vi khuẩn <i>Vibrio cholerae</i> là một trong những tác nhân phổ biến nhất gây ngộ độc trong nguồn nước, đặc biệt là ở các quốc gia đang phát triển. Việc phát hiện nhanh CT có ý nghĩa quan trọng để kiểm soát chất lượng vệ sinh nguồn nước sinh hoạt và ăn uống cũng như chẩn đoán nhanh nguyên nhân gây ngộ độc từ vi khuẩn <i>V. cholerae</i> , giúp ngăn ngừa nguy cơ bùng phát thành đại dịch. Trong nghiên cứu này, que thử phát hiện nhanh CT được chế tạo dựa trên kỹ thuật sắc ký miễn dịch kẹp đôi và đánh giá các đặc tính kỹ thuật chính. Nồng độ kháng thể phun trên vạch kiểm chứng và vạch thử nghiệm được khảo sát lần lượt là 1,3 µg/cm và 4 µg/cm. Huyền phù nano vàng kích thước 15±2 nm, OD ₅₂₀ =1 được tổng hợp và cộng hợp với kháng thể bất giữ ở nồng độ 200 µg/mL trong điều kiện pH 9. Que thử có khả năng phát hiện CT ở ngưỡng phát hiện 10 ng/mL trong thời gian 10 phút. Độ nhạy và độ đặc hiệu của que thử lần lượt là 96,97% và 100%. Những kết quả này là cơ sở để chế tạo các bộ sinh phẩm phát hiện nhanh tác nhân sinh học gây bệnh trong nước và thực phẩm.
TỪ KHÓA Tác nhân gây bệnh ngộ độc thực phẩm Độc tố cholera <i>Vibrio cholerae</i> Sắc ký miễn dịch Que thử phát hiện nhanh	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.9523>

* Corresponding author. Email: hoangviet1015@gmail.com

1. Mở đầu

Mỗi năm trên thế giới có khoảng 1,3 đến 4 triệu người mắc bệnh tả dẫn tới 21.000 đến 143.000 người chết trong số đó [1]. Nguyên nhân chính gây bệnh tả là do độc tố cholera (CT) được sinh tổng hợp bởi vi khuẩn *Vibrio cholerae* có mặt trong các nguồn nước hoặc thực phẩm không đảm bảo vệ sinh [2]. Đây là loại độc tố bền nhiệt, chúng chỉ bị tiêu diệt hoặc phá vỡ cấu trúc khi đun nóng ở 121 °C trong 30 phút [3]. CT có khả năng gây ra đáp ứng với tế bào ruột người ở nồng độ 18,1 ng/mL và tăng mạnh ở 181 ng/mL [4]. Khi thử nghiệm CT với người, triệu chứng phổ biến của bệnh tả xuất hiện bắt đầu với liều tiêu thụ là 5 µg và tăng mạnh với liều 25 µg [5]. Độc tố này có thể gây nên tình trạng mất nước do tiêu chảy cấp, sốc hoặc thậm chí là tử vong nếu không được phát hiện và điều trị kịp thời.

Để phát hiện vi khuẩn tả *V. cholerae* sinh CT, phương pháp PCR là phương pháp được sử dụng phổ biến nhất cho phép phát hiện gene *ctx* của CT với độ nhạy và độ chính xác cao [6], [7]. Bên cạnh đó, một số phương pháp như nuôi cấy phân lập trong môi trường chọn lọc, DNA probe, LAMP và ELISA cũng được áp dụng. Mặc dù cho kết quả chính xác, điểm hạn chế của những phương pháp này là khó áp dụng ngoài hiện trường do đòi hỏi các thiết bị hiện đại đi kèm, thời gian phân tích kéo dài. Hiện nay, để phát hiện các tác nhân gây bệnh, phương pháp sắc ký miễn dịch là một trong những hướng tiếp cận được chú trọng hàng đầu có thể khắc phục những nhược điểm trên. Phương pháp sắc ký miễn dịch kẹp đôi có độ đặc hiệu tương đối cao nhờ sử dụng 2 kháng thể đồng thời để bắt cặp đặc hiệu với độc tố và nhận biết bằng tín hiệu màu có thể quan sát được bằng mắt thường khi gắn kháng thể với chất đánh dấu. Đặc biệt, hạt nano vàng là chất đánh dấu ưu việt được ứng dụng nhiều trong nghiên cứu chế tạo que thử phát hiện nhanh bởi đặc tính tương thích sinh học cao, tỷ lệ bề mặt so với thể tích lớn, dễ tổng hợp, tính chất quang học vượt trội [8]. Trên thế giới, nhiều công trình nghiên cứu chế tạo que thử sắc ký miễn dịch để phát hiện độc tố vi sinh vật đã được ghi nhận, tuy nhiên, theo tìm hiểu của nhóm nghiên cứu, các công bố đối với que thử phát hiện nhanh CT còn hạn chế, với ngưỡng phát hiện là 10 ng/mL [9], [10]. Ở Việt Nam, nhóm tác giả Phạm Đức Minh đã chế tạo thành công que thử phát hiện CT ở nồng độ 50 ng/mL và 25 ng/mL với độ nhạy lần lượt là 95 % và 53 % [11], tuy nhiên, ngưỡng phát hiện còn tương đối cao. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu để chế tạo que thử phát hiện nhanh CT đạt ngưỡng phát hiện tương đương công bố trên thế giới là 10 ng/mL với độ nhạy lớn hơn 90 %, có thể ứng dụng trực tiếp ngoài hiện trường, giúp kiểm soát chất lượng vệ sinh nguồn nước cho bộ đội trong các hoạt động huấn luyện, dã ngoại.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Màng nitrocellulose Immumopore FP, màng thấm hút trên, màng hút mẫu, màng cộng hợp của hãng Whatman, kháng thể đơn dòng IgG từ chuột C01592M (KT1), C01593M (KT2) (Meridian, Mỹ), CT, Staphylococcal enterotoxin A (SEA), Staphylococcal enterotoxin B (SEB), Shiga toxin type 2 (Stx2) (Toxin Technology, Mỹ), kháng thể đa dòng từ dê kháng IgG của chuột AB6789 (KT3) (Abcam, Anh), $\text{HAuCl}_4.3\text{H}_2\text{O}$ và các hóa chất khác của hãng Sigma, Merck, Thermo Scientific...

Thiết bị, dụng cụ được sử dụng: Máy phun mẫu bán tự động Linomat (Thụy Sĩ), tủ sấy Froilabo (Pháp), máy khuấy từ gia nhiệt Cole Palmer (Mỹ), máy vortex (Mỹ), máy ly tâm lạnh Orto alresa (Tây Ban Nha).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Kiểm tra khả năng bắt cặp của CT và kháng thể bằng phản ứng ELISA gián tiếp

Quy trình đánh giá khả năng bắt cặp của độc tố và kháng thể bằng phương pháp ELISA gián tiếp được xây dựng theo tài liệu của hãng Abcam, Anh [12]. Cụ thể, một lượng CT nồng độ 100

ng/mL pha trong đệm carbonat pH 9,6 được bổ sung vào 09 giếng trên đĩa ELISA, ủ ở 4 °C qua đêm. Sau khi ủ, các giếng được rửa bằng 250 μ L đệm rửa có thành phần là Tween 20 0,05 % pha trong đệm PBS 1X, pH 7,4 và tiếp tục bổ sung 200 μ L BSA 1 %, ủ ở 37 °C trong 2 giờ. Sau khi rửa, bổ sung lần lượt 100 μ L các mẫu theo thứ tự: nước deion (giếng 1-3), kháng thể sơ cấp nồng độ 4 μ g/mL C01592M - KT1 (giếng 4-6), C01593M - KT2 (giếng 7-9), ủ 37 °C trong 1 giờ. Loại bỏ kháng thể không liên kết bằng đệm rửa trước khi bổ sung 100 μ L kháng thể thứ cấp AB6789-KT3 0,2 μ g/mL, ủ ở 37 °C trong 1 giờ sau đó rửa bằng đệm rửa. Lượng 50 μ L cơ chất 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) được bổ sung vào mỗi giếng và hỗn hợp được ủ 30 phút ở 37 °C. Sau đó, một lượng 50 μ L H₂SO₄ 1N được bổ sung để dừng phản ứng. Trong môi trường axit, sản phẩm phản ứng chuyển sang màu vàng, cường độ màu được đo ở bước sóng 450 nm.

2.2.2. Nghiên cứu tạo hạt vàng nano cho quá trình cộng hợp kháng thể

Dung dịch huyền phù hạt vàng nano kích thước 15 ± 2 nm và 30 ± 2 nm được tổng hợp theo phương pháp sinh trưởng hạt (seeded growth method) dựa trên các nghiên cứu trước và có sự thay đổi về quy trình [8], [13]. Trước tiên, hạt vàng mầm được tổng hợp bằng cách sử dụng 100 mL HAuCl₄ 0,035 % và bổ sung 20 mL dung dịch natri citrate 1 %, đun sôi kết hợp khuấy từ ở tốc độ 700 v/p đến khi dung dịch chuyển sang màu đỏ rượu vang. Sau đó, dung dịch có chứa 200 mL HAuCl₄ 0,02 % và 1,687 mL dung dịch hạt vàng mầm được bổ sung thêm 6,0 mL natri citrate 1% (để tạo hạt 15 nm) hoặc 5,1 mL natri citrate 1 % (để tạo hạt 30 nm). Đun sôi 30 phút kết hợp với khuấy tốc độ 1100 v/p. Thêm 30 mL natri citrate 1 % để dừng phản ứng. Để nguội, kiểm tra bước sóng hấp thụ cực đại, chụp ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua TEM và phân tích phổ EDX hạt vàng sau khi tổng hợp. Kích thước hạt vàng được phân tích bằng phần mềm ImageJ và Origin.

2.2.3. Cộng hợp hạt vàng vào kháng thể

Huyền phù nano vàng 15 nm được điều chỉnh đến pH 9 sử dụng đệm borate 0,1 M, pH 11 sau đó bổ sung thêm 30 μ L kháng thể C01592M (KT1) nồng độ 200 μ g/mL cho quá trình cộng hợp, lắc 20 phút bằng máy vortex với tốc độ 800 v/p. Sau đó, 30 μ L BSA 1 % được bổ sung vào ống, lắc ở điều kiện như trên. Dung dịch được ly tâm với tốc độ 10.000 v/p ở 25 °C trong 30 phút. Loại bỏ dịch nổi và hòa lại cặn ở đáy ống với 160 μ L đệm PBS 1X pH 7,4 bổ sung 5 % sucrose, 2 % sorbitol, 1 % mannitol, 0,1 % PEG, 0,1 % Tween, và 0,04 % NaN₃. Một lượng 10 μ L kháng thể cộng hợp với hạt vàng được nhỏ lên màng cộng hợp và sấy ở 37 °C trong 5 giờ để tạo màng cộng hợp cho quá trình hoàn thiện que.

2.2.4. Khảo sát nồng độ kháng thể thích hợp cố định trên màng nitrocellulose

Kháng thể KT3 và kháng thể KT2 lần lượt được cố định tại vị trí vạch kiểm chứng (vạch C) và vạch thử nghiệm (vạch T) lên màng nitrocellulose bằng thiết bị phun mẫu Linomat với tốc độ phun 50 nL/s, độ ẩm 50-60 %. Màng sau đó được xử lý với dung dịch BSA 1 % trong 10 phút và rửa bằng dung dịch SDS 0,1 % trước khi sấy khô ở 37 °C trong 5 giờ. Dựa trên kết quả nghiên cứu trước đây [13], trong nghiên cứu này, để tối ưu lượng kháng thể phun trên màng nitrocellulose, kháng thể KT3 nồng độ 2 mg/mL được cố định lên màng nitrocellulose với lượng khác nhau bao gồm 0,6; 1,3; 2,0; 2,6 μ g/cm. Lượng kháng thể thấp nhất vẫn đảm bảo tín hiệu vạch C có thể quan sát rõ nét bằng mắt thường được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Tương tự, kháng thể KT2 cũng được cố định lên vạch T với lượng 2,0; 4,0; 8,0 μ g/cm.

Que thử phát hiện nhanh CT được lắp ráp hoàn chỉnh với 4 màng theo thứ tự: màng thấm hút trên, màng nitrocellulose phun KT3 và KT2 lần lượt ở vạch C và vạch T, màng cộng hợp và màng hút mẫu được cố định trên tấm đế polyethylene với kích thước 65 mm x 3 mm.

2.2.5. Xác định thời gian và nồng độ phát hiện thấp nhất, độ nhạy và độ đặc hiệu của que thử

Thử nghiệm khả năng phát hiện của que thử với các mẫu độc tố nồng độ 5 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL, 1 μ g/mL. Mỗi nồng độ được thử nghiệm lặp lại 30 lần. Nồng độ phát

hiện thấp nhất là nồng độ độc tố nhỏ nhất mà que thử cho kết quả dương tính (xuất hiện vạch đỏ ở vị trí C và T có thể quan sát bằng mắt thường) với tối thiểu 90 % số lượng mẫu phân tích. Thời gian phát hiện được tính từ lúc nhỏ mẫu đến khi hiện rõ 2 vạch.

Độ nhạy của que thử ở mỗi nồng độ độc tố được xác định là tỉ lệ số lượng que cho kết quả dương tính thật trên tổng số lượng que thử cho kết quả dương tính thật và âm tính giả.

Độ đặc hiệu của que thử được đánh giá bằng cách thử nghiệm que thử với mẫu đệm PBS 1X (lặp lại 15 lần) và các mẫu độc tố chuẩn khác là SEA, SEB, Stx2 ở nồng độ 100 ng/mL (lặp lại 5 lần mỗi độc tố). Độ đặc hiệu của que thử được xác định là tỉ lệ số lượng que thử cho kết quả âm tính thật trên tổng số lượng que thử cho kết quả âm tính thật và số lượng que dương tính giả.

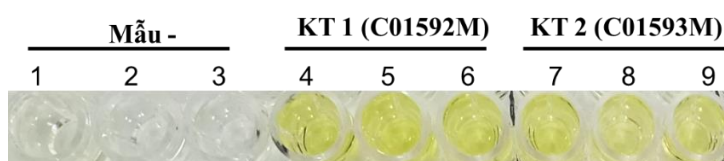
2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Phương pháp T-test student được sử dụng để so sánh số liệu giữa các nhóm kết quả khác nhau. Thí nghiệm lặp lại 3 lần lấy giá trị trung bình và được thể hiện $\pm$ độ lệch chuẩn với giá trị $p < 0,05$ có ý nghĩa thống kê.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kiểm tra khả năng bắt cặp của CT và kháng thể bằng phản ứng ELISA

Để chế tạo que thử phát hiện nhanh CT theo phương pháp sắc ký miễn dịch kẹp đôi, 03 loại kháng thể được sử dụng bao gồm 02 kháng thể sơ cấp bắt cặp đặc hiệu với CT; 01 kháng thể thứ cấp có gắn enzyme peroxidase - HRP bắt cặp với kháng thể sơ cấp. Khả năng bắt cặp giữa CT - kháng thể sơ cấp - kháng thể thứ cấp được kiểm tra bằng phản ứng ELISA gián tiếp, dựa trên cường độ màu đo được tại bước sóng 450 nm của sản phẩm tạo thành của phản ứng thủy phân giữa cơ chất TMB và enzyme HRP gắn trên kháng thể thứ cấp. Giá trị OD_{450} càng cao càng thể hiện khả năng bắt cặp tốt giữa phức độc tố - kháng thể sơ cấp - kháng thể thứ cấp. Kháng thể sơ cấp nào bắt cặp với độc tố tốt hơn (giá trị OD_{450} cao hơn) sẽ được ưu tiên sử dụng để phát hiện độc tố trong mẫu (cộng hợp với hạt vàng), kháng thể sơ cấp còn lại sẽ đóng vai trò là kháng thể bắt giữ được cố định trên vạch thử nghiệm (vạch T). Kết quả cho thấy, độ hấp thụ bước sóng 450 nm của sản phẩm sau phản ứng ELISA trong các giếng chứa kháng thể sơ cấp C01592M (KT1) và C01593M (KT2) lần lượt là $0,632 \pm 0,009$ và $0,49 \pm 0,011$ (Hình 1), khác biệt có ý nghĩa với mẫu đối chứng âm không chứa kháng thể sơ cấp ($p < 0,05$). Điều này chứng tỏ, hai loại kháng thể sơ cấp đều có khả năng bắt cặp với độc tố và đồng thời bắt cặp được với kháng thể thứ cấp AB6789 (KT3), phù hợp cho chế tạo que thử phát hiện CT. KT1 bắt cặp với độc tố tốt hơn nên được sử dụng để cộng hợp với hạt vàng, KT2 được cố định trên vạch T và KT3 được cố định trên vạch C.

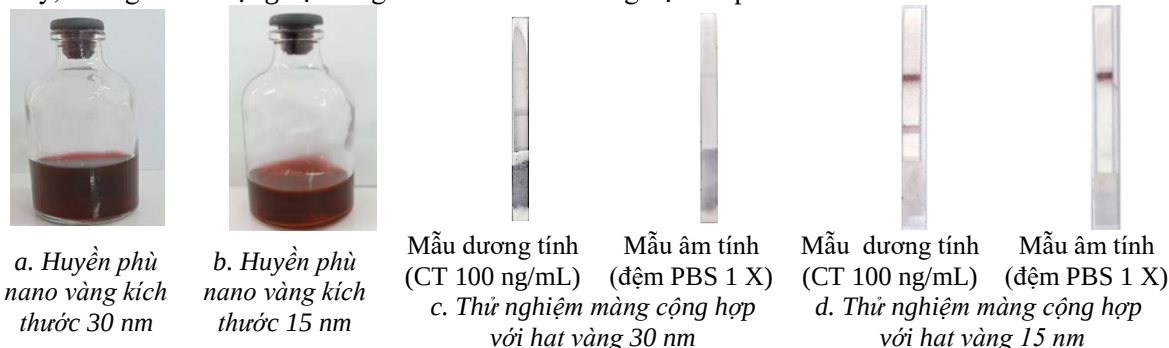


Hình 1. Kiểm tra khả năng bắt cặp giữa CT và kháng thể bắt cặp đặc hiệu bằng phương pháp ELISA gián tiếp

3.2. Tạo hạt nano vàng và cộng hợp hạt nano vàng với kháng thể phát hiện

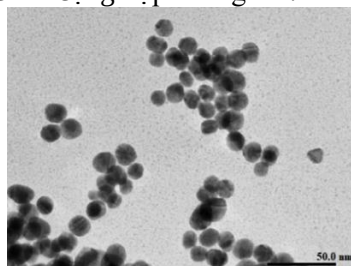
Kích thước hạt vàng có ảnh hưởng lớn đến độ ổn định của liên kết giữa hạt vàng và kháng thể cộng hợp từ đó ảnh hưởng đến độ nhạy và ngưỡng phát hiện của que thử. Để lựa chọn được hạt vàng có kích thước phù hợp cho quá trình chế tạo que thử, huyền phù hạt nano vàng với kích thước 30 ± 2 nm và 15 ± 2 nm được tổng hợp, cộng hợp với KT1 và so sánh khả năng phát hiện CT. Kết quả cho thấy, khi sử dụng hạt vàng 30 nm, khả năng giải phóng kháng thể trên màng cộng hợp kém dẫn tới tín hiệu trên que mờ và khó nhận biết. Trong khi đó, kháng thể được cộng hợp với hạt vàng 15 nm có khả năng giải phóng tốt khỏi màng cộng hợp, tín hiệu trên que được quan sát rõ nét (Hình 2). Kết quả này tương tự công trình nghiên cứu tạo que thử phát hiện

protein PBP2a của nhóm tác giả M. Amini (2020), khi so sánh giữa hạt 15 nm và 35 nm, hạt vàng 15 nm cho tín hiệu tốt và ổn định cao hơn trong quá trình tổng hợp [15]. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hạt vàng 15 nm cho các thí nghiệm tiếp theo.

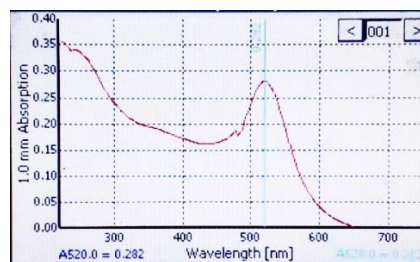


Hình 2. Kết quả sử dụng hạt vàng có kích thước khác nhau để phát hiện CT

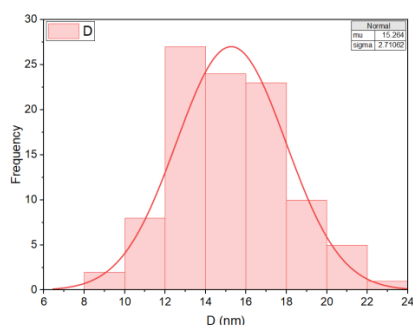
Bước sóng hấp thụ cực đại và hình ảnh hạt vàng 15 nm được soi dưới kính hiển vi điện tử truyền qua TEM được thể hiện trong Hình 3 và Hình 4. Hình ảnh phân tích kích thước hạt vàng bằng phần mềm ImageJ và Origin cũng như phổ EDX huyền phù nano vàng sau khi tổng hợp được thể hiện trong Hình 5 và Hình 6. Hạt vàng 15 nm có độ hấp thụ ở bước sóng 520 ± 2 nm (tương đương độ hấp thụ hạt vàng tiêu chuẩn 15 nm của hãng Sigma). Qua nhiều tạo hạt vàng, chúng tôi thu được huyền phù nano vàng có OD₅₂₀ trong khoảng 0,2-0,3. Để tăng khả năng bắt cặp với kháng thể và duy trì độ ổn định của quy trình chế tạo, mẫu vàng được cô đặc đến OD₅₂₀ = 1 trước khi cộng hợp kháng thể.



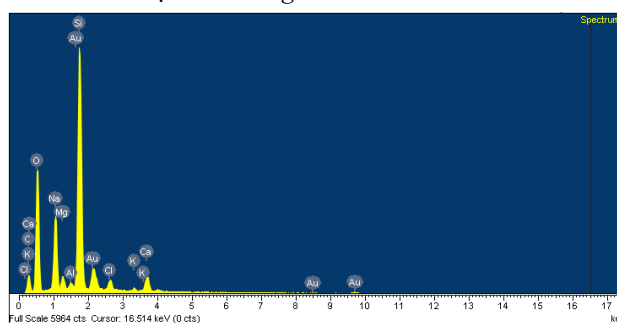
Hình 3. Hạt vàng được soi dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)



Hình 4. Bước sóng hấp thụ cực đại của huyền phù hạt nano vàng kích thước 15 nm



Hình 5. Hình ảnh phân tích kích thước hạt nano vàng

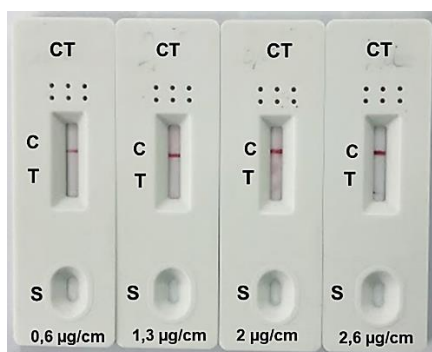


Hình 6. Phổ EDX dung dịch hạt nano vàng

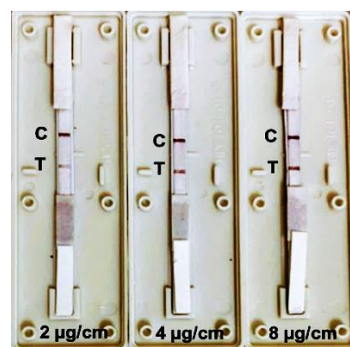
3.3. Tối ưu lượng kháng thể cố định trên màng nitrocellulose

Vạch kiểm chứng của que thử CT được phun kháng thể thứ cấp KT3 với lượng khác nhau (từ 0,6-2,6 $\mu\text{g}/\text{cm}$) và đánh giá tín hiệu màu khi thử nghiệm với 100 μL dung dịch đệm PBS 1X pH 7.4. Kết quả cho thấy, sau khoảng 5-7 phút, tín hiệu trên vạch C xuất hiện ở tất cả các que thử

nghiệm. Trong đó, nồng độ kháng thể từ 1,3 -2,6 $\mu\text{g}/\text{cm}$ cho tín hiệu đậm, rõ nét và dễ dàng quan sát bằng mắt thường hơn so với nồng độ 0,6 $\mu\text{g}/\text{cm}$ (Hình 7). Để tiết kiệm chi phí chế tạo, trong các nghiên cứu tiếp theo, kháng thể thứ cấp KT3 với nồng độ 1,3 $\mu\text{g}/\text{cm}$ (0,39 $\mu\text{g}/\text{que}$) được lựa chọn để cố định trên vạch C. Nồng độ này thấp hơn so với nồng độ kháng thể sử dụng phun trên vạch C trong nghiên cứu của nhóm tác giả Trần Thị Sao Mai (2015) là 1,2 $\mu\text{g}/\text{que}$ [14] hay công trình nghiên cứu chế tạo que thử phát hiện nhanh độc tố Stx2 của chúng tôi trước đây (sử dụng KT thứ cấp 0,45 $\mu\text{g}/\text{que}$) [13]. Đối với vạch thử nghiệm, các que thử được phun kháng thể KT2 nồng độ 4-8 $\mu\text{g}/\text{cm}$ cho vạch màu đậm, rõ nét, nồng độ 2 $\mu\text{g}/\text{cm}$ cho tín hiệu mờ và mảnh hơn (Hình 8). Do đó, chúng tôi lựa chọn nồng độ KT2 ở vạch thử nghiệm là 4 $\mu\text{g}/\text{cm}$ (1,2 $\mu\text{g}/\text{que}$) cho các nghiên cứu tiếp theo.



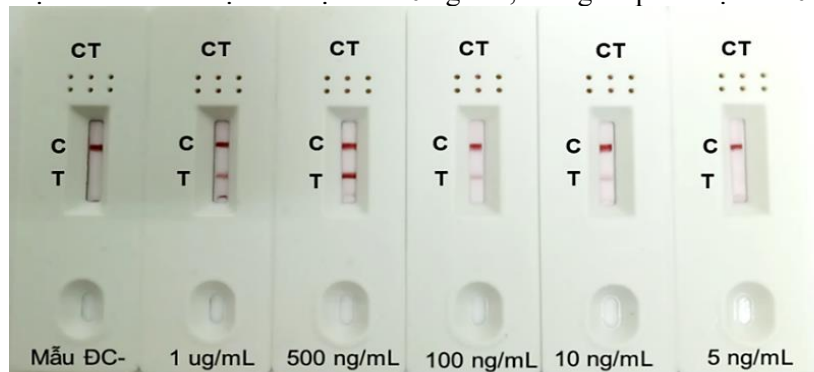
Hình 7. Tín hiệu trên vạch kiểm chứng C khi sử dụng kháng thể thứ cấp KT3 với các nồng độ khác nhau



Hình 8. Tín hiệu trên vạch thử nghiệm T khi sử dụng kháng thể phát hiện KT2 với các nồng độ khác nhau

3.4. Xác định nồng độ độc tố phát hiện thấp nhất, thời gian phát hiện, độ nhạy và độ đặc hiệu của que thử

Kết quả thử nghiệm que thử với các mẫu độc tố có nồng độ khác nhau cho thấy, sau 5 phút xuất hiện màu ở vạch C và sau khoảng 10 ± 2 phút xuất hiện rõ màu ở vạch T có thể quan sát rõ nét bằng mắt thường với các mẫu độc tố từ 10 ng/mL đến 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Hình 9). Ở nồng độ 500 ng/mL, que thử cho tín hiệu rõ nét nhất (cao hơn so với nồng độ độc tố 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Điều này có thể được giải thích là do khi nồng độ độc tố quá cao, sự bắt cặp giữa độc tố và kháng thể tại màng cộng hợp nhiều làm cản trở khả năng di chuyển của phức độc tố - kháng thể cộng hợp hạt vàng lên màng nitrocellulose. Bên cạnh đó, hiện tượng một vài que xuất hiện vệt mảnh ở vị trí mép dưới màng nitrocellulose có thể là do khi nhỏ mẫu, các phức phân tử cộng hợp được giải phóng cùng lúc và di chuyển nhanh theo lực mao dẫn gây ra sự cản trở không gian và làm cho một phần nhỏ bị giữ lại trên màng nitrocellulose. Trong nghiên cứu này, nồng độ phát hiện thấp nhất của que thử phát hiện nhanh CT được xác định là 10 ng/mL, thời gian phát hiện là 10 phút.



Hình 9. Xác định nồng độ phát hiện thấp nhất của que thử CT

Độ nhạy của que thử đạt được ở các nồng độ thử nghiệm lần lượt là 100 % (nồng độ độc tố từ 100 ng/mL đến 1 µg/mL) và 96,67 % (nồng độ độc tố 10 ng/mL) (Bảng 1). Do đó, trong nghiên cứu này, nồng độ phát hiện thấp nhất của que thử được xác định là 10 ng/mL với độ nhạy 96,67 %. Kết quả xác định nồng độ phát hiện thấp nhất của que thử CT tương đương với công bố của Eiki Yamasaki và cộng sự (2013) [9]. Thời gian phát hiện của que thử là khoảng 10 phút. Trong một số nghiên cứu khác, giới hạn phát hiện của một số que thử sắc ký miễn dịch được ghi nhận như độc tố SEA, B, C, D, E là 1-5 ng/mL [16], độc tố Stx2 là 25 ng/mL [17], độc tố botulinum là 25 ng/mL với serotype-A và 10 ng/mL với serotype-B [18].

Bảng 1. Kết quả xác định nồng độ phát hiện thấp nhất và độ nhạy của que thử phát hiện CT

Nồng độ thử nghiệm (ng/mL)	Tổng số lượng que thử nghiệm	Số lượng que thử CT thử nghiệm		Độ nhạy (%)
		Kết quả âm tính (-)	Kết quả dương tính (+)	
1000	30	0	30	100
500	30	0	30	100
100	30	0	30	100
10	30	1	29	96,67
5	30	18	12	53,3

Kết quả xác định độ đặc hiệu của que thử CT cho thấy, 30/30 que cho kết quả âm tính khi thử nghiệm với mẫu đệm PBS 1X và các mẫu độc tố SEA, SEB, Stx2 nồng độ 100 ng/mL (Bảng 2). Như vậy, trong nghiên cứu này, que thử phát hiện nhanh độc tố CT được xác định có độ đặc hiệu 100 %, que thử không xảy ra hiện tượng phản ứng chéo với các độc tố SEA, SEB, Stx2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu của que thử phát hiện CT

Mẫu	Tổng số lượng que thử nghiệm	Số que thử CT thử nghiệm	
		Kết quả dương tính (+)	Kết quả âm tính (-)
Đệm PBS 1 X	15	0	15
Độc tố SEA 100 ng/mL	5	0	5
Độc tố SEB 100 ng/mL	5	0	5
Độc tố Stx2 100 ng/mL	5	0	5

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tối ưu quy trình chế tạo và đánh giá một số đặc tính kỹ thuật của que thử phát hiện nhanh CT của vi khuẩn *V. cholerae* gây bệnh tả với nồng độ tối ưu kháng thể phun lên vạch kiểm chứng (AB6789) và vạch thử nghiệm (C01593M) lần lượt là 0,39 µg/que và 1,2 µg/que; màng cộng hợp có chứa kháng thể C01592M cộng hợp dung dịch hạt vàng 15 nm được tổng hợp theo phương pháp sinh trưởng hạt. Que thử có khả năng phát hiện CT tinh khiết với nồng độ thấp nhất là 10 ng/mL với độ nhạy 96,67 % trong thời gian 10 phút, độ đặc hiệu là 100 % và không xảy ra hiện tượng phản ứng chéo với các độc tố khác là SEA, SEB, Stx2. Với những kết quả đã đạt được, que thử cho thấy tiềm năng rất lớn để ứng dụng trong kiểm nghiệm chất lượng nước, chẩn đoán nguyên nhân gây bệnh ngộ độc do vi khuẩn *V. cholerae*.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài Viện KH-CN quân sự năm 2022: “Nghiên cứu cải tiến bộ phương tiện phân tích trên xe lọc nước BΦC-2,5 ứng dụng trong huấn luyện, diễn tập, dã ngoại”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] M. Ali, A. R. Nelson, A. L. Lopez, and D. A. Sack, “Updated global burden of cholera in endemic countries,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 9, no. 6, pp. 1-13, 2015.
- [2] J. J. Mekalanos, E. J. Rubin, and M. K. Waldor, “Cholera: Molecular basis for emergence and pathogenesis,” *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, vol. 18, pp. 241-248, 1997.

-
- [3] D. Margosch, M. Moravek, M. G. Gänzle, E. Märtlbauer, R. F. Vogel, and M. A. Ehrmann, "Effect of high pressure and heat on bacterial toxins," *Food Technology and Biotechnology*, vol. 43, no. 3, pp. 211–217, 2005.
- [4] J. Ye *et al.*, "Real-Time Cell Analysis for Monitoring Cholera Toxin-Induced Human Intestinal Epithelial Cell Response," *Curr. Microbiol.*, vol. 70, no. 4, pp. 536–543, 2015.
- [5] S. Achtsnicht *et al.*, "Sensitive and rapid detection of cholera toxin subunit B using magnetic frequency mixing detection," *PLoS One*, vol. 14, no. 7, pp. 1–15, 2019.
- [6] K. Hoshino *et al.*, "Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139," *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, vol. 20, no. 3, pp. 201–207, 1998.
- [7] J. F. Mehrabadi, P. Morsali, H. R. Nejad, and A. A. I. Fooladi, "Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* with new multiplex PCR," *J. Infect. Public Health*, vol. 5, no. 3, pp. 263–267, 2012.
- [8] W. Leng, P. Pati, and P. J. Vikesland, "Room temperature seed mediated growth of gold nanoparticles: mechanistic investigations and life cycle assesment," *Environ. Sci. Nano*, vol. 2, no. 5, pp. 440–453, 2015.
- [9] E. Yamasaki *et al.*, "Development of an immunochromatographic test strip for detection of cholera toxin," *BioMed Research International*, vol. 2013, pp. 1–7, 2013.
- [10] E. Frohnmeyer *et al.*, "Aptamer lateral flow assays for rapid and sensitive detection of cholera toxin," *Analyst*, vol. 144, no. 5, pp. 1840–1849, 2019.
- [11] D. M. Pham and V. L. Hoang, "Studying Development of Rapid Test to Detect *Vibrio Cholerae* Toxin," *Journal of Military Pharmaco-medicine*, vol. 2, pp. 18–26, 2015.
- [12] Abcam, "Indirect ELISA protocol," 2022. [Online]. Available: <https://www.abcam.com/protocols/indirect-elisa-protocol>. [Accessed Oct. 15, 2022].
- [13] L. A. To, T. T. Q. Tran, K. H. V. Nguyen, V. T. To, N. V. H. Nguyen, N. T. Nguyen, and Q. H. Le, "Development of immunochromatographic test strip for rapid detection of shiga toxin type 2 in food," *Journal of Analytical Sciences*, vol. 4, pp. 9–19, 2018.
- [14] T. S. M. Tran, T. K. T. Nguyen, and Q. H. Le, "Development of a Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Milk," *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, vol. 31, no. 1, pp. 23–31, 2015.
- [15] M. Amini *et al.*, "Optimising effective parameters to improve performance quality in lateral flow immunoassay for detection of PBP2a in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)," *J. Exp. Nanosci.*, vol. 15, no. 1, pp. 266–279, 2020.
- [16] W. Wang, L. Liu, L. Xu, H. Kuang, J. Zhu, and C. Xu, "Gold-Nanoparticle-Based Multiplexed Immunochromatographic Strip for Simultaneous Detection of Staphylococcal Enterotoxin A, B, C, D, and E," *Part. Part. Syst. Charact.*, vol. 33, no. 7, pp. 388–395, 2016.
- [17] T. Lu *et al.*, "Rapid detection of Shiga toxin type II using lateral flow immunochromatography test strips of colorimetry and fluorimetry," *Analyst*, vol. 145, no. 1, pp. 76–82, 2020.
- [18] K. H. Ching, A. Lin, J. A. McGarvey, L. H. Stanker, and R. Hnasko, "Rapid and selective detection of botulinum neurotoxin serotype-A and -B with a single immunochromatographic test strip," *J. Immunol. Methods*, vol. 380, no. 1–2, pp. 23–29, 2012.