

PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH *LEPTOSPIRA* TỪ NƯỚC TIỂU CHÓ NGHI MẮC BỆNH LEPTOSPIROSIS Ở THÀNH PHỐ CẦN THƠ

Nguyễn Thị Bé Mười¹, Hồ Thị Việt Thu¹, Trần Đình Từ²

TÓM TẮT

leptospirosis là một bệnh truyền nhiễm chung của nhiều loài động vật và người, hiện diện phổ biến khắp thế giới. Sự lưu hành huyết thanh học của *Leptospira* được ghi nhận trên chó nuôi ở khu vực đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Gần đây, xuất hiện những trường hợp chó nghi mắc leptospirosis với triệu chứng vàng da, xuất huyết niêm mạc, chảy nước mắt, đau cơ và rối loạn thận-niệu... đã được đưa đến khám và điều trị tại các bệnh xá thú y trong khu vực. Mục tiêu của nghiên cứu này là phát hiện xoắn khuẩn *Leptospira* gây bệnh trên chó. Một trăm mười một (111) mẫu nước tiểu chó có hiệu giá MAT $\geq$ 1:400 đã được thu thập để phát hiện sự hiện diện của xoắn khuẩn bằng phương pháp quan sát dưới kính hiển vi nền đen. Xoắn khuẩn ở những mẫu nước tiểu dương tính được nuôi cấy tiếp trên môi trường EMJH, giám định xoắn khuẩn bằng PCR và giải trình tự gen 16S rRNA để định danh loài.

Kết quả quan sát bằng kính hiển vi nền đen đã phát hiện xoắn khuẩn hiện diện trong 63/111 (56,75%) mẫu nước tiểu, nhưng chỉ nuôi cấy *Leptospira* thành công trên môi trường EMJH từ 3 trong số 63 mẫu nước tiểu này (chiếm tỷ lệ 4,76%). Kết quả giám định phân tử xoắn khuẩn đã phát hiện *Leptospira interrogans* trong hai mẫu nước tiểu của chó có biểu hiện nhiễm bệnh lâm sàng và *Leptospira fainei* hiện diện trong một mẫu nước tiểu của chó chưa biểu hiện bệnh, trong đó *L. interrogans* thuộc nhóm xoắn khuẩn gây bệnh trực tiếp và *L. fainei* thuộc nhóm xoắn khuẩn gây bệnh cơ hội. Đây là kết quả phân lập và định danh xoắn khuẩn *Leptospira* gây bệnh từ nước tiểu chó đầu tiên ở Việt Nam.

Từ khóa: chó, *Leptospira*, nước tiểu, nuôi cấy, định danh, thành phố Cần Thơ

Isolation and identification of *Leptospira* from the urine of dogs with suspected leptospirosis in Can Tho city

Nguyen Thi Be Muoi, Ho Thi Viet Thu, Tran Dinh Tu

SUMMARY

leptospirosis is a popularly zoonotic disease of the worldwide. The sero-prevalence of leptospirosis was reported in the domestic dogs in the Mekong Delta. Recently, the dogs suspecting leptospirosis with the clinical syndromes, such as: jaundice, mucosal hemorrhage, oculo-nasal discharge, abdominal pain and renal dysfunction were recorded in the veterinary clinics in the investigating area. The objective of this study was to detect the *Leptospira* species causing leptospirosis in the dogs. One hundred and eleven (111) urine samples were collected from the suspected dogs to detect the presence of leptospira by a dark-field microscopy; leptospira from the positive samples was inoculated in the EMJH medium, then *Leptospira* species were identified by PCR assay, and 16S rRNA gene sequence.

The results of dark-field microscopic examination showed that leptospira was present in 63 out of 111 (56.75%) urine samples, however leptospira was cultured successfully on EMJH medium from only 3 out of 63 positive urine samples, accounting for 4.76%. The results of analysing leptospira gene sequences revealed two species, i.e. *Leptospira interrogans* and *Leptospira fainei* presenting in the urine of the investigated dogs, of which *L. interrogans* belonged to the mainly pathogenic group and *L. fainei* belonged to the associated pathogenic group. This is the first successful study on isolation and identification of pathogenic *Leptospira* from the urine of the dogs suspecting leptospirosis in Viet Nam.

Keywords: dogs, *Leptospira*, urine, culture, identification, Can Tho city.

¹ Bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp và SHUD, Đại học Cần Thơ

² Hội Thú y Việt Nam

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

leptospirosis là bệnh truyền nhiễm chung cho nhiều loài động vật và người, gây ra bởi một số loài xoắn khuẩn gây bệnh (Pathogenic *Leptospira* species). Bệnh phổ biến khắp thế giới, nhiều nhất ở vùng nhiệt đới có khí hậu nóng, ẩm, thuận lợi cho sự tồn tại của xoắn khuẩn ở bên ngoài cơ thể (Evangelista và Coburn, 2010). Xoắn khuẩn gây bệnh ký sinh trong ống thận và được bài thải qua nước tiểu làm ô nhiễm môi trường (Alder *et al.*, 2010). Chuột cống là nguồn tàng trữ xoắn khuẩn chính trong tự nhiên và chó cũng là nguồn truyền lây bệnh quan trọng cho người và các động vật khác (Syke *et al.*, 2011).

Leptospira là những xoắn khuẩn hiếu khí, Gram âm, có hình dạng mảnh mai với những vòng cuộn xoắn đều đặn và đầu cuối có hình móc câu. Chi *Leptospira* hiện được chia thành 21 loài dựa vào sự so sánh trình tự nucleotide của gen 16S rRNA và kết quả nghiên cứu lai DNA-DNA. Dựa vào trình tự nucleotide của gen này để phân tích cây sinh dòng (phylogenetic tree analysis), chi *Leptospira* được chia thành 3 cụm loài: gây bệnh (pathogenic), gây bệnh trung gian (intermediate-pathogenic) và hoại sinh (saprophytic *Leptospira*) (Levett, 2001).

Chẩn đoán bệnh leptospirosis không thể dựa hoàn toàn vào khám xét lâm sàng, do chó có nhiều dạng bệnh với những biểu hiện lâm sàng rất khác nhau, có thể đồng nhiễm hoặc kế nhiễm với một số căn nguyên gây bệnh khác (Vasconcellos, 1979). Phương pháp vi ngưng kết (MAT) vẫn được OIE (2008 và 2014) khuyến cáo sử dụng trong sàng lọc bệnh, nhưng phương pháp này thiếu độ tin cậy cần thiết trong chẩn đoán xác định leptospirosis, nhất là những trường hợp nhiễm trùng mạn tính (Lilenbaum và Martins, 2014). Do vậy, các phương pháp chẩn đoán khác, trong đó có các phương pháp phân tử đã được áp dụng để chẩn đoán phát hiện xoắn khuẩn gây bệnh và trong các nghiên cứu về dịch tễ học của bệnh này (Balamurugan *et al.*, 2013; Cosson *et al.*, 2014).

Kết quả khảo sát huyết thanh học trước đây của chúng tôi (Nguyễn Thị Bé Mười và cs., 2015) cho thấy chó nuôi và chuột cống ở Cần Thơ nhiễm xoắn khuẩn khá phổ biến. Thời gian gần đây, nhiều chó

ngheim bệnh Leptospirosis được đưa tới khám và điều trị tại các bệnh xá thú y trong khu vực. Chó mắc bệnh có biểu hiện các triệu chứng lâm sàng như sốt, đau cơ, đau vùng bụng, chảy nước mắt và mũi, rối loạn tiêu hóa, xuất huyết niêm mạc và vàng da.

Nghiên cứu này nhằm chẩn đoán phát hiện căn nguyên gây bệnh bằng phương pháp phân lập và giám định phân tử *Leptospira* gây bệnh từ nước tiểu chó bệnh. Kết quả nghiên cứu sẽ cung cấp những bằng chứng khoa học trợ giúp các bác sỹ thú y trong chẩn đoán phát hiện leptospirosis trên chó.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm và đối tượng thu thập mẫu nước tiểu

Nước tiểu chó chưa tiêm vaccin phòng bệnh leptospirosis được đưa tới khám và điều trị tại các bệnh xá thú y ở thành phố Cần Thơ được thu thập. Những chó lấy nước tiểu đồng thời được lấy máu và thu thập những thông tin về độ tuổi, giống, giới tính và phương thức nuôi.

Đối tượng nghiên cứu là 111 mẫu nước tiểu chó có hiệu giá MAT $\geq 1:400$, bao gồm cả chưa có biểu hiện bệnh và đã xuất hiện triệu chứng lâm sàng của bệnh. Mẫu nước tiểu chó bao gồm 3 nhóm tuổi: từ 4 tháng đến dưới 1 năm tuổi (19 chó); từ 1 đến dưới 6 năm tuổi (45 chó) và 47 chó lớn hơn 6 năm tuổi. Trong số này có 61 chó đực và 50 chó cái, 58 chó nuôi thả rông và 53 chó nuôi nhốt. Những chó này sẽ được kiểm tra nước tiểu liên tục 3 ngày bằng kính hiển vi nền đen, nếu có xoắn khuẩn hiện diện trong nước tiểu thì tiến hành nuôi cấy.

Mẫu nước tiểu được hứng khi chó bài tiểu hoặc lấy trực tiếp từ bàng quang bằng dụng cụ chuyên dụng vô trùng có dung tích 6–20 ml. Nước tiểu được bảo quản trong thùng lạnh và đưa ngay đến phòng thí nghiệm. Sau đó, ly tâm 3.000 vòng/phút trong 10 phút và loại bỏ phần nước trong, lấy phần cặn lắng bên dưới để soi kính hiển vi tụ quang nền đen. Nếu thấy có xoắn khuẩn thì lấy 3 ml nước tiểu cho qua lọc Seitz với kích thước lỗ lọc là 0,22 μ m để loại bỏ tạp khuẩn. Việc nuôi cấy xoắn khuẩn từ nước tiểu phải được thực hiện trong vòng 2 giờ sau khi thu thập mẫu vì *Leptospira* chết nhanh trong nước tiểu (WHO, 2003).

2.2. Phương pháp nuôi cấy xoắn khuẩn

Việc nuôi cấy xoắn khuẩn *Leptospira* được thực hiện tại Bộ môn Thú y-Trường Đại học Cần Thơ và Phòng Sinh học phân tử -Viện Pasteur Tp. HCM từ tháng 7 năm 2016 đến tháng 5 năm 2017.

Lấy 1,5 ml nước tiểu sau khi qua lọc Seitz (Sartorius Stedim Biotech, Việt Nam) cho vào ống nghiệm có chứa 6 ml môi trường EMJH, trộn hỗn hợp dung dịch này 10 giây, để ở nhiệt độ 28°C-30°C và sau đó được kiểm tra đều đặn 2 lần/tuần. Nếu quan sát thấy các ống môi trường nuôi cấy có hiện tượng vẩn đục như làn khói thì xác định có xoắn khuẩn phát triển và được cấy chuyển sang ống mới chứa môi trường EMJH để tiếp tục theo dõi. Các mẫu nuôi cấy đồng thời được kiểm tra bằng kính hiển vi tụ quang nền đen 2 lần/tuần, nếu phát hiện có xoắn khuẩn phát triển thì tiến hành thực hiện ly trích DNA.

Môi trường Ellinghausen-McCullough-Johnson (EMJH) dùng cho nuôi cấy xoắn khuẩn *Leptospira* được pha chế theo quy trình của Viện Pasteur Tp. HCM có bổ sung kháng sinh 5-fluorouracil 100 µg/ml để ức chế sự phát triển của các vi khuẩn vấy nhiễm.

2.3. Phương pháp định danh xoắn khuẩn

Việc định danh xoắn khuẩn *Leptospira* dựa vào khuếch đại gen 16S rRNA của xoắn khuẩn bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự nucleotide gen 16S rRNA được thực hiện tại Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa (cskh@phusabiochem.com).

DNA tổng số được ly trích bằng phương pháp sốc nhiệt theo trình tự: đun canh khuẩn ở 100°C trong 10 phút; làm lạnh nhanh trong nước đá 5 phút, rồi bảo quản DNA ở -20 °C (Trần Nhân Dũng, 2011).

Gen 16S rRNA được khuếch đại bằng cặp mồi tổng quát 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') và 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Weisberg et al. 1991) do Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa tổng hợp. Vùng gen được khuếch đại có kích thước gần tới 1500 bp.

Phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể

tích 50 µL trên máy T100 (Biorad/Mỹ). Thành phần 1 phản ứng PCR bao gồm:

- DNA tổng số 50-100 ng.
- Master Mix 2X (thành phần bao gồm Taq, dNTPs, buffer 2X) (PHUSA Biochem cung cấp)
- Mồi 27F và 1492R với nồng độ là 0,4 µM (PHUSA Biochem cung cấp)

Chu kỳ nhiệt của phản ứng như sau: Biến tính ở 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ gồm biến tính 30 giây, gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, tổng hợp DNA ở 72°C trong 1 phút 45 giây và cuối cùng phản ứng được duy trì 72°C trong 5 phút.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose với nồng độ 1,5% trong dung dịch đệm TBE1X ở 90V trong 45 phút và quan sát dưới tia UV, chụp ảnh bằng phần mềm Quantity One. Mẫu được lưu giữ để kiểm tra và giải trình tự gen. Thang chuẩn 100 bp được mua từ công ty Fermentas.

Giải trình tự gen 16S rRNA tự động trên máy ABI 3130 Sequencer. Kết quả giải trình tự được dựa vào phần mềm BioEdit và ClustalX, so sánh các trình tự gen thu được với các trình tự gen công bố trong GenBank bằng chương trình BLAST.

Nếu mức độ đồng nhất của trình tự nucleotide trong đoạn gen 16S rRNA đạt $\geq 95\%$ thì có thể xác định tới chi (genus) và $\geq 99\%$ thì có thể xác định tới loài (species).

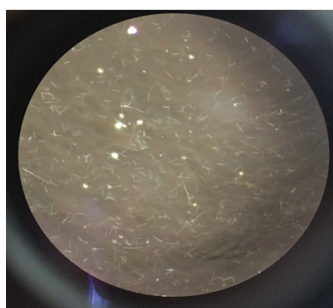
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát huyết thanh học và nuôi cấy *Leptospira* từ nước tiểu chó

Số liệu ở bảng 1 cho thấy, trong 111 mẫu nước tiểu chó khảo sát bằng soi kính hiển vi nền đen, đã phát hiện thấy 63 mẫu có xoắn khuẩn hiện diện trong nước tiểu, chiếm tỷ lệ 56,76%. Những chó này có hiệu giá kháng thể vi ngưng kết ≥ 1 : 400 và có sự hiện diện xoắn khuẩn trong nước tiểu liên tục 3 ngày khi kiểm tra bằng kính hiển vi nền đen. Trong đó, chó ở độ tuổi $\leq 1-6$ năm và ≥ 6 năm nghi nhiễm leptospirosis chiếm tỷ lệ cao hơn chó ở độ tuổi từ 4 tháng đến 1 năm. Chó nuôi thả có tỷ lệ nhiễm xoắn khuẩn cao hơn chó nuôi nhốt, trong khi không thấy có sự sai khác đáng kể giữa nhóm chó đực và chó cái.

Bảng 1. Kết quả khảo sát sự hiện diện *Leptospira* trong nước tiểu chó theo độ tuổi, giới tính và phương thức nuôi

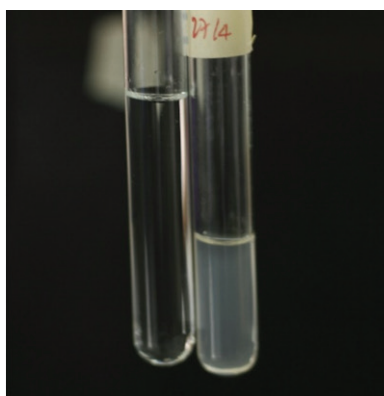
Các chỉ tiêu khảo sát	N	Độ tuổi			Giới tính		Phương thức nuôi	
		4 tháng-1 năm	≤1-6 năm	≥ 6 năm	Đực	Cái	Thả	Nhốt
Tổng số mẫu nước tiểu khảo sát	111	19	51	41	61	50	58	53
Số chó nghi nhiễm leptospirosis (MAT≥1:400 và soi kính hiển vi nền đen phát hiện <i>Leptospira</i>)	63	7	31	25	35	28	38	25
Tỷ lệ (%)	56,76	36,84	60,78	60,98	57,38	56,00	65,52	47,17
Tổng số mẫu nước tiểu cấy vào môi trường EMJH				63 mẫu				
Số mẫu nuôi cấy có xoắn khuẩn mọc vào thời điểm 17 ngày sau khi cấy				3 mẫu				

**Hình 1. Hình ảnh xoắn khuẩn trong nước tiểu soi dưới kính hiển vi nền đen (x40)**

Sáu mươi ba mẫu nước tiểu của chó nghi nhiễm leptospirosis này được cấy vào môi trường EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) có bổ sung 5-fluorouracil 100µg/ml để ức chế sự tăng trưởng các vi sinh vật vấy nhiễm và để ở nhiệt độ 28-30°C. Sau thời gian nuôi cấy kéo dài 3 tháng, kết quả nghiên cứu chỉ phát hiện được 3 trong 63 mẫu nước tiểu nuôi cấy có sự hiện diện của *Leptospira* ở thời điểm 17 ngày kể từ khi bắt đầu nuôi cấy, chiếm tỷ lệ 4,76%.

Trong 63 mẫu nước tiểu có sự hiện diện xoắn khuẩn *Leptospira* khi soi dưới kính hiển vi nền đen trước khi đem nuôi cấy, có 31 mẫu từ những chó có triệu chứng nghi mắc bệnh leptospirosis và 32 mẫu được lấy từ những chó không có biểu hiện lâm sàng rõ ràng của bệnh. Trong 3 mẫu nước tiểu nuôi cấy được *Leptospira*, có 2 mẫu nước tiểu lấy

từ chó có triệu chứng lâm sàng: bỏ ăn 4 ngày, ói 6 lần/ngày, nước tiểu vàng sậm, nhiệt độ lúc nhập viện 39,5°C, vàng da và 1 mẫu từ chó không có biểu hiện lâm sàng của bệnh. Điều này cho thấy khó có thể chẩn đoán phát hiện leptospirosis nếu chỉ dựa hoàn toàn vào lâm sàng như Vasconcellos (1979) đã nhận xét.

**Hình 2. Hình ảnh xoắn khuẩn mọc trong môi trường EMJH sau 17 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 28-30°C**

Việc nuôi cấy xoắn khuẩn *Leptospira* từ nước tiểu của chó là một công việc hết sức khó khăn (WHO, 2003). Bên cạnh tốc độ phát triển chậm của xoắn khuẩn làm cho thời gian nuôi cấy kéo dài, một số loài xoắn khuẩn lại có sức sống yếu, rất dễ bị chết hoặc ít có khả năng sống sót ở bên ngoài cơ thể (Evangelista và Coburn, 2010). Mặt khác, mẫu nước

tiểu cũng hay bị nhiễm tạp khuẩn. Một số công bố về phân lập *Leptospira* từ nước tiểu chó của các tác giả trên thế giới cho kết quả đối lập nhau. Harkin *et al.* (2003) không phân lập được *Leptospira* từ nước tiểu chó nghi nhiễm leptospirosis, ngược lại Alongkorn *et al.* (2017) phân lập được xoắn khuẩn ở 4/58 mẫu nước tiểu chó, chiếm 6,89%.

Trong khi đó, chẩn đoán bằng những kỹ thuật sinh học phân tử khác nhau lại cho kết quả phát hiện *Leptospira* trong nước tiểu chó cao hơn hẳn. Harkin *et al.* (2003) sử dụng kỹ thuật PCR đã phát hiện 8,2% chó có sự hiện diện của *Leptospira* trong nước tiểu (41/500 chó). Ở Ireland, Rojas *et al.* (2010) thấy có 7,05% (37/525) chó có *Leptospira* trong nước tiểu và ở Iran, Zakeri *et al.* (2010) công bố là 22% chó bài thải *Leptospira* qua nước tiểu. Trong một vài nghiên cứu khác, Khorami *et al.* (2010) ứng dụng kỹ thuật PCR cho thấy có 31% (28/90) chó có sự hiện diện của xoắn khuẩn *Leptospira* trong nước tiểu và kết quả nghiên cứu của Chetta *et al.* (2014) là 14,21% (26/183). Nhìn chung, kết quả của những nghiên cứu này đã phản ánh tỷ lệ *Leptospira* hiện diện

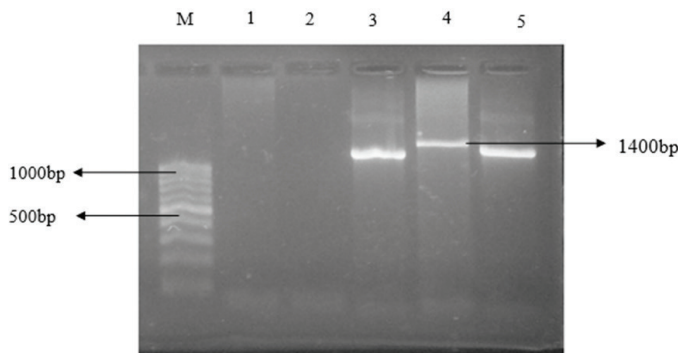
trong nước tiểu trong khoảng 7,05%-31%, điều đó cho thấy tình trạng mang trùng *Leptospira* của chó nuôi khá phổ biến ở nhiều nước trên thế giới.

Kết quả nghiên cứu của các tác giả nói trên và của chúng tôi cho thấy việc chẩn đoán phát hiện sự hiện diện của *Leptospira* trong nước tiểu bằng các kỹ thuật sinh học phân tử có lẽ thuận lợi hơn nhiều so với phương pháp nuôi cấy phân lập xoắn khuẩn.

Tuy vậy, việc nuôi cấy thành công *Leptospira* từ mẫu nước tiểu chó trong nghiên cứu này là một kết quả rất đáng được khích lệ và đây là công bố đầu tiên về việc phân lập được xoắn khuẩn từ nước tiểu chó ở Việt Nam.

3.2. Kết quả định danh xoắn khuẩn *Leptospira* phân lập từ nước tiểu chó

Kết quả định danh xoắn khuẩn *Leptospira* trong các mẫu nuôi cấy bằng kỹ thuật PCR khuếch đại gen 16S rRNA của xoắn khuẩn cho thấy cả 3 mẫu canh khuẩn có xoắn khuẩn mọc đều cho kết



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5%, với hiệu điện thế 90V, thời gian 45 phút
Mẫu 1, 2 là mẫu nuôi cấy âm tính. Mẫu 3, 4 và 5 là mẫu nuôi cấy dương tính

quả PCR dương tính. Ba mẫu gen này đã được tiến hành giải trình tự và so sánh với trình tự nucleotide gen 16S rRNA của một số loài xoắn khuẩn được công bố trên Ngân hàng Gen. Kết quả cho thấy mẫu số 3 với tổng số nucleotide được giải trình tự là 1374nt và mẫu số 5 với tổng số nucleotide là 1369nt, tương đồng với loài xoắn khuẩn tham chiếu *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae strain RGA có mã số NR 116542.1 trên Ngân hàng Gen ở mức $\geq 99\%$. Do vậy, có thể xác định hai mẫu xoắn khuẩn phân lập được từ nước tiểu chó ở Cần Thơ thuộc loài xoắn

khuẩn gây bệnh *Leptospira interrogans*. Mẫu số 4 với tổng số nucleotide được giải trình tự là 1393nt, khi so sánh với chủng xoắn khuẩn tham chiếu *Leptospira fainei* serovar Hurstbridge strain BUT6 có mã số trên Ngân hàng Gen là NR 043049.1 cũng đạt mức độ tương đồng $\geq 99\%$ và có thể xác định thuộc loài gây bệnh cơ hội *Leptospira fainei* (intermediate pathogenic *Leptospira*).

Việc định danh vi khuẩn dựa vào so sánh trình tự nucleotide của gen 16S rRNA đã được Hookey *et al.* áp dụng để định danh các loài

Bảng 2. Kết quả xác định loài xoắn khuẩn dựa vào so sánh trình tự nucleotide gen 16S rRNA

Tên mẫu khảo sát	Các chủng xoắn khuẩn so sánh	Mã gen	Mức độ tương đồng	Tên loài xoắn khuẩn được xác định
3	<i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Icterohemorrhagiae</i> strain RGA 16S ribosomal gene	NR 116542.1	99%	<i>Leptospira interrogans</i>
5	<i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Icterohemorrhagiae</i> strain RGA 16S ribosomal gene	NR 116542.1	99%	<i>Leptospira interrogans</i>
4	<i>Leptospira fainei</i> serovar <i>Hurstbridge</i> strain BUT6 16S ribosomal gene	NR 043049.1	99%	<i>Leptospira fainei</i>

xoắn khuẩn trong họ *Leptospiraceae* vào năm 1993. Bên cạnh việc sử dụng các gen mục tiêu khác, một số nhà nghiên cứu vẫn tiếp tục sử dụng gen 16S rRNA để định danh nhóm xoắn khuẩn gây bệnh này ở người và các động vật nuôi khác (Morey *et al.*, 2006; Balamurugan *et al.*, 2013; Backstedt *et al.*, 2015). Điều đó chứng tỏ việc giải và so sánh trình tự nucleotide của gen 16S rRNA là một công cụ quan trọng trong định danh phân loại các loài xoắn khuẩn. Trên GenBank, có sẵn các dữ liệu về trình tự nucleotide của gen 16S rRNA của các loài xoắn khuẩn *Leptospira* khác nhau, tuy nhiên trong nhiều trường hợp chỉ một phần gen này được giải trình tự. Trong nghiên cứu của chúng tôi, số lượng nucleotide được giải trình tự khá cao (1369-1393nt), chiếm gần hết độ dài của gen 16S rRNA. Do vậy có cơ sở để tin chắc rằng kết quả so sánh định danh loài *Leptospira* trong nghiên cứu của chúng tôi là đáng tin cậy.

Kết hợp kết quả định danh loài xoắn khuẩn với kết quả giám định huyết thanh học bằng phương pháp vi ngưng kết được thực hiện đồng thời trên cùng mẫu chó đã xác định xoắn khuẩn gây nhiễm hai chó nói trên thuộc serovar *Icterohaemorrhagiae* (*Leptospira interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae*) và một chó thuộc serovar *Hurstbridge* (*Leptospira fainei* serovar *Hurstbridge*).

Bằng phương pháp định danh phân tử, chúng tôi đã phát hiện được 2 loài xoắn khuẩn *Leptospira interrogans* và *Leptospira fainei* bài thải qua nước tiểu chó nuôi tại Cần Thơ mà từ trước tới nay ở Việt Nam chưa có nghiên cứu

nào công bố. Đặc biệt, *Leptospira fainei* là loài xoắn khuẩn gây bệnh cơ hội lần đầu tiên được xác định gây nhiễm trên chó ở Việt Nam. Cả hai loài xoắn khuẩn này đều có thể truyền lây sang người (Levett, 2001; Adler *et al.*, 2010). Do vậy, việc phát hiện hai loài xoắn khuẩn gây nhiễm trên chó này không những chỉ có ý nghĩa rất lớn đối với khoa học thú y mà còn đưa ra cảnh báo mỗi nguy cơ tiềm ẩn đang đe dọa sức khỏe cộng đồng cư dân trong khu vực. Tuy nhiên đây chỉ mới là những kết quả nghiên cứu bước đầu, việc định danh các loài xoắn khuẩn gây bệnh trên chó cũng như trên những động vật khác cần được tiếp tục nghiên cứu trong thời gian tới.

IV. KẾT LUẬN

Đã phân lập thành công *Leptospira* từ nước tiểu của 3 trong số 63 chó nghi mắc leptospirosis ở thành phố Cần Thơ, chiếm tỷ lệ 4,76%. Số mẫu nước tiểu này được lấy từ hai chó có biểu hiện lâm sàng và một chó chưa xuất hiện các triệu chứng của bệnh leptospirosis.

Bằng phương pháp định danh phân tử, đã phát hiện ít nhất có 2 loài *Leptospira interrogans* thuộc nhóm *Leptospira* gây bệnh và *Leptospira fainei* thuộc nhóm xoắn khuẩn gây bệnh cơ hội hiện diện trong nước tiểu chó tại thành phố Cần Thơ. Đây là hai loài xoắn khuẩn gây nhiễm trên chó được phân lập và định danh đầu tiên ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adler, B and A.D.L.P. Moeztzuma, 2010. *Leptospira* and leptospirosis. Overview of the biology of

- Leptospira* and how recent progress in genetic research will contribute to our understanding of *Leptospira* pathogenesis. *Veterinary Microbiology*, 140, (3-4): 287-296.
2. Alongkorn, K., P. Chanchaithong, K. Lugsomya, W. Niyomtham, W. Vanaporn and N. Prapasarakul, 2017. Molecular detection and isolation of pathogenic *Leptospira* from asymptomatic humans, domestic animals and water sources in Nan province, a rural area of Thailand. *Research in Veterinary Science*, 115: 146-154.
 3. Balamurugan V., N. L. Gangadhar, N. Mohandoss, S. R. A. Thirumalesh, M. Dhar, R. Shome, P. Krishnamoorthy, K. Prabhudas and H. Rahman, 2013. Characterization of *Leptospira* isolates from animals and humans: phylogenetic analysis identifies the prevalence of intermediate species in India. *SpringerPlus*, 2: 1-9.
 4. Backstedt, B. T., O. Buyuktanir, J. Lindow, E. A. Wunder, Jr. M. G. Reis, S. Usmani-Brown, M. Ledizet, A. Ko and U. Pal, 2015. Efficient Detection of Pathogenic *Leptospira* Using 16S Ribosomal RNA. *PlosOne June*, 19: 1-18.
 5. Chetta, M., D. Vicari, S. Agnello, M. Percipalle, V. Ferrantelli and M. Vitale, 2014. Canine leptospirosis cases and molecular screening for *Leptospira interrogans* infection. *Pakistan Veterinary Journal*, 34 (2): 260-262.
 6. Evangelista, K.V and J. Coburn, 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 5(9): 1413-1425.
 7. Geisen, V., C. Stengel, S. Brem, W. Muller, C. Greene and K. Hartmann, 2007. Canine leptospirosis infections – clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *Journal of Small Animal Practice*, 48: 324-328.
 8. Hookey J.V., J. Bryden and L. Gatehouse, 1993. The use of 16S *Leptospiraceae* rDNA sequence analysis to investigate the phylogeny of and related spirochaetes. *Journal of General Microbiology*, 139: 2585-2590.
 9. Lilenbaum, W and G. Martins, 2014. leptospirosis in Cattle: A Challenging Scenario for the Understanding of the Epidemiology. *Transboundary Emerging Diseases*, 61: 63-68.
 10. Harkin, K.R., Y.M. Roshto, J.T. Sullivan, T.J. Purvis and M.M. Chengappa, 2003. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of *Leptospira* in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222 (9): 1230 -1233.
 11. Ko, A.I., C. Goarant and M. Picardeau, 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7: 736-747.
 12. Khorami, N., A. Malmasi, S. Zakeri, T.Z. Salehi, G. Abdollahpour, S.M. Nassiri and A. Nejati, 2010. Screening urinalysis in dogs with urinary shedding of *Leptospira*. *Comparative Clinical Pathology*, 19: 271-274.
 13. OIE, 2008. OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.1.9 In: leptospirosis, 251-263.
 14. OIE, 2014. OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.1.9 In: leptospirosis, 1-15.
 15. Rojas, P., A.M. Monahan, S. Schuller, I.S. Miller, B.K. Markey and J.E. Nally, 2010. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 29: 1305-1309.
 16. Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson, 1997. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings National Academy Sciences USA*, 74 (12): 5463-5467.
 17. Sykes, J. E., K. Hartmann, K. F. Lunn, G. E. Moore, R. A. Stoddard and R. E. Goldstein, 2011. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *Journal Veterinary Internal Medicine*, 25 (1): 1-13.
 18. Trần Nhân Dũng, 2011. Sổ tay thực hành sinh học phân tử, NXB ĐHTC: 7- 9.
 19. Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane, 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, 173 (2): 697-703.
 20. WHO, 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Isolation and culture of leptospires: 81-82.
 21. Vasconcellos, S.A, 1979. Diagnóstico laboratorial da leptospirose. *Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, 3: 189-194.
 22. Zakeri, S., N. Khorami, Z.F. Ganji, N. Sepahian, A.A. Malmasi, M.M. Gouya and N.D. Djadid, 2010. *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. *Infection, Genetics and Evolution*, 10 (2): 273-277.
- Ngày nhận 20-12-2017
 Ngày phản biện 15-2-2018
 Ngày đăng 1-6-2018