

hỏi phải nội soi hoặc can thiệp ngoại khoa. Nếu mẫu không được lấy một cách chính xác và vô trùng thì kết quả từ việc nuôi cấy mẫu phân ít có giá trị sử dụng để chọn lựa cách điều trị thích hợp.

5.11. Loại trừ bệnh lý gan trong ca bệnh có nôn ra máu hoặc đi phân đen khi men gan bình thường hoặc chỉ tăng nhẹ

Trường hợp này cần đánh giá acid mật để xác định suy gan là nguyên nhân gây xuất huyết dạ dày và mất lớp bảo vệ niêm mạc dạ dày. Do đó chỉ các thông số sinh hóa sẽ không đủ để loại trừ sự liên quan đến gan.

5.12. Chọn xét nghiệm theo giống

Cách nhìn phiên diện có thể khiến các bác sĩ lâm sàng chọn các chỉ tiêu xét nghiệm dựa theo giống của thú bệnh. Ví dụ như chỉ xét nghiệm phản ứng miễn dịch giống trypsin trên chó Berger, xét nghiệm acid mật trên giống Yorkshire Terrier hoặc Miniature Schnauzers hoặc chỉ xét nghiệm albumin trên giống chó Sharpeis.

5.13. Không có kế hoạch các bước tiếp theo sau một liệu pháp điều trị

Khi một phác đồ điều trị được thực hiện thì bác sĩ lâm sàng nên chuẩn bị các bước tiếp theo nếu phác đồ hiện tại không đáp ứng. Nếu không dự báo trước thì rất có thể là bạn sẽ kê đơn một loại thuốc hoặc một khẩu phần khác rồi lại không thành công. Điều đó sẽ làm lãng phí thời điểm chẩn đoán và làm cho chủ nuôi mất sự tin tưởng vào bạn khi bạn muốn đề nghị các xét nghiệm bổ sung sau đó.

VI. KẾT LUẬN

Một bác sĩ lâm sàng giỏi sẽ chọn lựa một cách khôn ngoan từ các xét nghiệm bổ sung sẵn có trên thị trường để đảm bảo rằng các xét nghiệm hữu ích nhất sẽ được thực hiện ngay để hỗ trợ cho việc chẩn đoán chính xác bệnh dạ dày-ruột. Cần hết sức lưu ý khi giải thích các kết quả để đảm bảo rằng thông tin có được từ các xét nghiệm được sử dụng một cách phù hợp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tạp chí Focus, special edition, Royal Canin, 2006.

LEPTOSPIRA VÀ LEPTOSPIROSIS

(Bài tổng hợp)

Trần Đình Từ

Hội Thú y Việt Nam

Leptospirosis là một bệnh lây truyền từ động vật sang người phổ biến nhất trên trái đất, đang nổi lên như là một vấn đề sức khỏe cộng đồng ở nhiều nước. Các biểu hiện lâm sàng của leptospirosis trên con người rất đa dạng, từ nhẹ- giống như bệnh cúm mùa đến một dạng bệnh nặng được gọi là hội chứng Weil. Dạng bệnh nặng đặc trưng với những biểu hiện vàng da, suy thận và suy gan cấp, viêm phổi và xuất huyết, có thể dẫn đến chết (Faine *et al.*, 1999). Leptospirosis do các xoắn khuẩn thuộc chi *Leptospira*, bao gồm cả các loài có khả năng gây bệnh và không gây bệnh. Leptospirosis có phân bố địa lý rộng khắp, xảy ra ở cả nông thôn và thành thị ở vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và cả vùng ôn đới. Sự bùng phát dịch bệnh ở các nước phát triển thường liên quan đến sự phơi nhiễm do tiếp xúc nghề nghiệp (Benschop *et al.*, 2009), du lịch hoặc các sự kiện thể thao (Stern *et al.*, 2010). Các nước đang phát triển đang mang gánh nặng chính của căn bệnh với nửa triệu trường hợp được báo cáo bị nhiễm hàng năm, tỷ lệ tử vong dao động từ 5 đến 10% (McBride *et al.*, 2005).

Bài báo này sẽ tập trung vào những tiến bộ gần đây trong việc làm sáng rõ quá trình sinh bệnh leptospirosis, đặc biệt là các yếu tố khác nhau đóng vai trò trong độc lực. Sự phát triển các công cụ di truyền và các mô hình động vật có sẵn để định dạng và xác định đặc tính của các protein xoắn khuẩn khác nhau liên quan đến sinh bệnh học cũng sẽ được thảo luận.

I. SINH HỌC *LEPTOSPIRA*

1.1. Phân loại

Theo phân loại truyền thống, tất cả các xoắn khuẩn được chia làm hai loài: *Leptospira biflexa* là những xoắn khuẩn hoại sinh, trong khi *L. interrogans* bao gồm tất cả các loài *Leptospira* gây bệnh (Plank và Deal, 2000). Hiện nay việc sử dụng phân loại dựa trên đặc điểm di truyền phân tử cho thấy có ít nhất 21 loài chia làm 3 nhóm dựa theo độc lực của chúng: gây bệnh (pathogenic), gây bệnh cơ hội (intermediate pathogenic) và hoại sinh (saprophytic leptospira). Bảy loài *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. kirschneri* và *L. alexanderi* là những tác nhân chính của bệnh leptospirosis (Ahmed *et al.*, 2006).

Tất cả các loài *Leptospira* đã được phát hiện phân chia thành 24 nhóm huyết thanh và 250 serovar (Palaniappan *et al.*, 2007) dựa trên biểu hiện của lipopolysaccharide trên bề mặt (LPS) (Adler và Moctezuma, 2010). Các sự khác biệt về cấu trúc trong phần carbohydrate của LPS xác định sự đa dạng kháng nguyên trong nhiều nhóm serovar. Các serovar chứa kháng nguyên chông chéo các yếu tố quyết định được phân loại thành một nhóm huyết thanh lớn hơn. Phân tích phát sinh loài của gen 16S rRNA cho thấy rằng các loài *Leptospira* phân thành ba nhóm được xác định là gây bệnh, hoại sinh và trung gian (Levett *et al.*, 2006).

1.2. Sinh học tế bào

Leptospira là những xoắn khuẩn có hình dạng sợi mảnh, xoắn ốc, di động với chiều dài 6-20 μm . Hai đầu cuối của xoắn khuẩn này có hình dạng móc câu đặc biệt. *Leptospira* có cấu trúc bề mặt chia sẻ các đặc tính của hai nhóm vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Các màng đôi và sự hiện diện của LPS là đặc tính của vi khuẩn Gram âm, trong khi sự kết hợp chặt chẽ của màng tế bào chất với thành tế bào murein lại tương tự cấu trúc lồng bao của vi khuẩn Gram dương (Levett, 2001; Ko *et al.*, 2009; Vijayachari *et al.*, 2008).

Tính di động là chức năng của hai sợi lông

cạnh màng nguyên sinh chất (periplasmic flagella) hoặc còn gọi là nội lông (endoflagella) nhô ra từ mỗi đầu của vi khuẩn. Sự phá vỡ gen mã hóa *flaB flagellin* bằng chất đánh dấu kanamycin ở nhóm xoắn khuẩn hoại sinh *L. biflexa* thông qua sự tái tổ hợp tương đồng dẫn đến sự thiếu hụt nội lông, làm mất khả năng chuyển động của xoắn khuẩn (Charon và Goldstein, 2002; Wolgemuth *et al.*, 2006). Mặt khác, thể đột biến *fliY* chuyển đổi động cơ lông của *L. interrogans* gây bệnh thể hiện chuyển động xoay tròn bị giảm trong cả môi trường lỏng và bán rắn (Liao *et al.*, 2009). Thêm vào đó, chuột lang bị nhiễm thể đột biến *fliY* có tỷ lệ sống sót cao hơn so với những con bị nhiễm các chủng xoắn khuẩn hoang dã, gợi ý sự xoay vòng của nội lông và tính di động của xoắn khuẩn có thể có vai trò trong quá trình sinh bệnh của nhiễm trùng *Leptospira*.

1.3. Nuôi cấy xoắn khuẩn

Xoắn khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn phát triển tương đối chậm trong cả môi trường nuôi cấy lỏng và rắn. Sự tăng trưởng tối ưu của *Leptospira* được quan sát ở nhiệt độ từ 28 đến 30°C trong môi trường được bổ sung acid béo mạch dài, vitamin B1 và B12 và muối ammonium (Faine *et al.*, 1999; Adler và Moctezuma, 2010; Levett, 2001; Murray *et al.*, 2009). Axit béo mạch dài là nguồn carbon và năng lượng duy nhất hiện nay được biết và bị phá vỡ thông qua quá trình oxy hóa β . Môi trường thường được sử dụng nhiều nhất là Ellinghausen-McCullough/Johnson-Harris (EMJH), bao gồm axit oleic, albumin huyết thanh bò và polysorbate (Tween). Ngăn chặn sự nhiễm khuẩn bằng cách hấp ướt các thành phần môi trường cơ sở, bổ sung 5-fluorouracil và kháng sinh như axit nalidixic hoặc rifampicin (Faine *et al.*, 1999; Adler và Moctezuma, 2010; Levett, 2001) và khử trùng qua bộ lọc.

Một số chủng gây bệnh như *L. interrogans* cũng có thể tồn tại trong môi trường có chất dinh dưỡng thấp, như đất ẩm và nước ngọt trong một thời gian dài, với nồng độ muối, pH và độ nhớt là những yếu tố quan trọng (Trueba *et al.*, 2004).

Tuy nhiên, *L. borgpetersenii* không thể sống sót bên ngoài cơ thể vật chủ, phân tích gen cho thấy việc thiếu các gen quan trọng cần thiết cho sự tồn tại bên ngoài cơ thể vật chủ giới hạn sự lây truyền của nó thông qua tiếp xúc vật chủ-vật chủ một cách trực tiếp (Bulach *et al.*, 2006). Thử nghiệm bằng kính hiển vi và tấm polystyrene cho thấy *Leptospira* có khả năng tập hợp lại để hình thành một màng sinh học biofilm. Các chủng xoắn khuẩn hoại sinh hình thành màng sinh học sớm hơn các loài gây bệnh, và trong số các chủng được thử nghiệm, tính di động đường như không là cần thiết trong quá trình này (Ristow *et al.*, 2008). Sự hình thành biofilm được coi là một trong cơ chế được *Leptospira* sử dụng để tồn tại trong các hốc móng môi trường.

II. NHIỄM TRÙNG VÀ LEPTOSPIROSIS

Leptospirosis là một bệnh lây nhiễm phổ biến trên người và động vật. Nhiễm các chủng gây bệnh của *Leptospira* thường xảy ra thông qua tiếp xúc trực tiếp với nước tiểu động vật bị nhiễm bệnh hoặc gián tiếp qua nguồn nước bị ô nhiễm. Nhiều loài động vật có vú có thể mang trùng *Leptospira*, chứa các xoắn khuẩn trong các ống thận, dẫn đến bài thải qua nước tiểu. Chuột là nguồn mang trùng chính gây nhiễm bệnh leptospirosis cho người, bài thải nhiều *Leptospira* (10^7 xoắn khuẩn/ml) nhiều tháng sau khi nhiễm trùng. Mặt khác, con người được xem như là những vật chủ ngẫu nhiên, bị nhiễm trùng cấp tính đôi khi gây tử vong (Adler và Moctezuma, 2010; Ko *et al.*, 2009).

Leptospira xâm nhập vào cơ thể qua vết cắt hoặc vết trầy xước da hoặc thông qua màng nhầy mắt, mũi hoặc họng. Sự xuất hiện của bệnh ở người rất biến đổi, từ 1 ngày đến 4 tuần sau khi tiếp xúc và ở những người sống sót, nhiễm trùng có thể kéo dài hàng tháng (Plank và Dean, 2000). Leptospirosis có thể có nhiều dạng biểu hiện lâm sàng; mức độ nghiêm trọng phụ thuộc vào chủng *Leptospira* hoặc serovar có liên quan, lượng xoắn khuẩn xâm nhập (cho ít nhất một số chủng) cũng như tuổi, sức khỏe và tình trạng miễn dịch của cá nhân bị nhiễm

bệnh. Nhiều trường hợp được ghi nhận là nhẹ và tự giới hạn, có thể khó phân biệt với các bệnh truyền nhiễm khác, cho đến khi một chẩn đoán chính xác về bệnh leptospirosis được thực hiện. Các triệu chứng khác bao gồm nhức đầu, ớn lạnh, buồn nôn và nôn mửa, đau cơ và ít phát ban hơn. Bệnh nghiêm trọng nhất là hội chứng Weil, được đặc trưng bởi các biến chứng của hệ thống đa cơ quan, bao gồm vàng da, viêm màng não, xuất huyết phổi, rối loạn chức năng gan và thận, và trụy tim mạch. Tổn thương mạch và nội mô được quan sát thấy ở tất cả những nội tạng ảnh hưởng (Adler và Moctezuma, 2010; Levett, 2001; Ko *et al.*, 2009).

2.1. Sự lưu hành và dịch tễ học của leptospirosis

Bệnh leptospirosis ở người có phân bố địa lý rộng; Đông Nam Á, châu Đại Dương, Tiểu lục địa Ấn Độ, Caribê và Mỹ Latinh được coi là những vùng lưu hành đặc hữu của bệnh (Ko *et al.*, 2009). Ở những vùng này, sự thay đổi khí hậu và lũ lụt, mức độ vệ sinh kém và quần thể động vật lưu giữ mầm bệnh cao (ví dụ chuột) là những yếu tố quyết định quan trọng của sự lây nhiễm. Tỷ lệ hàng năm ở các khu vực này là 10-100 trên 100.000 dân, và tỷ lệ này tăng lên trong suốt ổ dịch và ở những quần thể có nguy cơ cao (Victoriano *et al.*, 2009). Một số vụ dịch gần đây được báo cáo ở cả hai vùng lưu hành và không lưu hành nằm trong khu vực giải trí. Những tay đua phiêu lưu ở bang Florida (Mỹ) (Stern *et al.*, 2005) và Borneo (Sejvar *et al.*, 2003) và các vận động viên sức bền từ Philippines (Teichmann *et al.*, 2001) và Illinois (Mỹ) (Morgan *et al.*, 1998) có biểu hiện lâm sàng của bệnh leptospirosis sau khi tham gia các sự kiện thể thao dưới nước.

Thập kỷ vừa qua đã chứng kiến sự thay đổi mô hình dịch tễ học của bệnh leptospirosis ở người. Trong vùng có bệnh không phổ biến như Canada, Mỹ và châu Âu, các ổ dịch lẻ tẻ xảy ra liên quan đến các hoạt động thể thao dưới nước trong môi trường tự nhiên bị ô nhiễm *Leptospira* gây bệnh (Morgan *et al.*, 1998; Stern *et al.*, 2005; Pappas *et al.*, 2008; Ciceroni *et al.*, 2000) hoặc các mẫu hình thay đổi khí hậu (Pappas *et*

al., 2008). Sự tăng tỷ lệ mắc bệnh leptospirosis ở Pháp và Cộng hòa Séc là do lũ lụt năm 1997 và 2002 (Pappas *et al.*, 2008).

Sự bùng phát ở các vùng lưu hành đặc biệt thường xảy ra với lượng mưa lớn xói mòn *Leptospira* trong đất vào nguồn nước. Ở khu vực châu Á - Thái Bình Dương, bệnh leptospirosis được coi là một căn bệnh lây truyền do nước; các vụ dịch gần đây ở Indonesia (2003), Ấn Độ (2005), Sri Lanka (2008) và Philippines (2009) xảy ra sau khi lũ lụt ở thành thị lớn, phân tán *Leptospira* trong vùng nước bị ô nhiễm (Victoriano *et al.*, 2009; McCurry, 2009). Ở những vùng nghèo tài nguyên này, thiếu điều kiện vệ sinh thích hợp và biến đổi khí hậu là những yếu tố chính đóng góp cho sự phát triển của bệnh leptospirosis ở người. Bệnh tật cũng được thấy ở các vùng nông thôn, với các hoạt động nông nghiệp như canh tác lúa và chăn nuôi là những yếu tố nguy cơ tiềm ẩn. Các quốc gia xa cách về địa lý như Brazil (Ko *et al.*, 1999) và Israel (Kariv *et al.*, 2001) báo cáo một sự thay đổi dịch tễ học về bệnh leptospirosis từ dịch lẻ tẻ ở vùng nông thôn đến một loại bệnh đô thị quan trọng. Đây cũng là trường hợp đối với nhiều nước đang phát triển, với dân số thành thị tăng và thiếu vệ sinh, lượng mưa lớn và tiếp theo ngập lụt dẫn đến sự gia tăng lây lan bệnh leptospirosis qua các loài gặm nhấm. Sự tái xuất hiện của bệnh ở các khu vực không lưu hành bệnh do sự phơi nhiễm giải trí và du lịch, đã trở thành một vấn đề chính về sức khỏe đô thị ở các vùng lưu hành cao. Hiện nay, leptospirosis được xem như là một căn bệnh toàn cầu đang nổi lên.

2.2. Đặc tính sinh bệnh

Cơ chế sinh bệnh học của *Leptospira* chưa được hiểu rõ; tuy nhiên, gần đây đã có những tiến bộ đáng kể. Các trình tự toàn bộ hệ gen của *Leptospira* gây bệnh như *L. interrogans* serovars Lai và Copenhageni, và *L. borgpetersenii* serovar Hardjo, cũng như hai chủng của *L. biflexa* sống tự do đã được giải mã (Bulach *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2004; Picardeau *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2003). Bộ gen *Leptospira* xấp xỉ 3,9-4,6 Mbp tùy thuộc vào chủng và loài, bao gồm hai nhiễm sắc thể dạng vòng. Một bản sao dạng

vòng thứ ba được gọi là p74, được tìm thấy trong *L. biflexa* nhưng không có trong các dòng gây bệnh; tuy nhiên, có 13 gen lưu trữ tìm thấy trong p74 lại có trong nhiễm sắc thể I của các dòng gây bệnh. p74 liên quan đến sự sống còn của *L. biflexa*, bởi vì các đột biến gen giữ vệ sinh (housekeeping genes) ảnh hưởng đến khả năng tồn tại của chủng hoại sinh này (Picardeau *et al.*, 2008). Bộ gen của *L. borgpetersenii* nhỏ hơn 700 kb so với *L. interrogans*, đó là dấu hiệu của sự suy giảm hệ gen (Bulach *et al.*, 2006). Một số gen cần thiết cho cảm biến môi trường cũng như vận chuyển và sử dụng chất chuyển hóa bị mất đi trong chủng này, hạn chế sự sống sót của *L. borgpetersenii* bên ngoài cơ thể động vật chủ. Ngược lại, *L. interrogans* có thể tồn tại trong môi trường nước cho đến khi gặp một ký chủ mới. Sự hiểu biết tốt hơn về con đường sinh bệnh và các yếu tố nguy cơ liên quan hiện nay đang được điều tra với sự sẵn có của trình tự bộ gen, công cụ di truyền và mô hình động vật có thể được sử dụng cho các nghiên cứu khác nhau.

2.3. Các mô hình leptospirosis trên động vật

Việc sử dụng các mô hình động vật trong thí nghiệm là không thể thiếu trong việc hiểu biết sinh học, truyền dẫn, sự chiếm hữu vật chủ và sinh bệnh học của *Leptospira*. Trong số các mô hình động vật được thiết lập cho bệnh leptospirosis, hamster thường được sử dụng do tính nhạy cảm cao với *Leptospira*, với leptospirosis cấp tính thể hiện các đặc điểm lâm sàng giống những trường hợp nhiễm bệnh nặng ở người (Haake, 2006). Mô hình này rất hữu ích trong việc xác định tính gây nhiễm và độc lực, kiểm tra thiệt hại đặc hiệu cơ quan gây ra bởi leptospirosis và trong sàng lọc vacxin tiềm năng cũng như đánh giá hiệu quả điều trị của nhiều loại thuốc (Haake, 2006; Griffith *et al.*, 2006). Chuột lang bị nhiễm *Leptospira* cũng biểu hiện bệnh leptospirosis lan tràn, làm cho chúng thích hợp hơn mô hình bệnh nặng (Nally *et al.*, 2004).

Số lượng *Leptospira* cần thiết có thể nhiễm bệnh ở động vật nhỏ thay đổi rất nhiều. Số lượng *Leptospira* 10^3 - 10^8 /ml được đưa vào

xoang bụng có thể gây ra nhiễm trùng dẫn đến chết (Silva *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008). Tuy nhiên, liều chết trung bình (LD_{50}) phụ thuộc vào serovar và chủng được sử dụng, và số lần cấy truyền qua ống nghiệm đối với hầu hết các chủng. Thử nghiệm thách thức với 10^8 *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae chủng Verdun sống dẫn tới tử vong 50% (Vernel-Pauillac *et al.*, 2010), nhưng cùng số lượng *L. interrogans* serovar Copenhageni chủng Fiocruz L1-130, *L. interrogans* serovar Canicola chủng Kito, *L. noguchii* serovar Australis chủng Hook và serovar Autumnalis chủng Bonito (Silva *et al.*, 2008) có những thay đổi. Các chủng này có tính độc hại cao ở chuột nhắt, với LD_{50} dao động từ 3 đến 100 *Leptospira*.

Leptospira thực nghiệm được thực hiện chủ yếu thông qua tiêm vào ổ bụng (Haake, 2006). Mặc dù phương pháp này cho phép đưa ra một lượng lặp lại của *Leptospira* vào một mô hình động vật, nó không phản ánh sự lây lan tự nhiên của mầm bệnh. Thử thách các phương pháp bằng cách lây nhiễm các động vật qua da (Truccolo *et al.*, 2002) hoặc niêm mạc mắt (Bolin, 2001) đã được sử dụng để bắt chước lối đi tự nhiên của *Leptospira* vào vật chủ.

Chuột cống và chuột nhắt được coi là vật chủ bảo tồn, và nhiễm trùng *Leptospira* chủ yếu là không có triệu chứng với vi khuẩn sau đó được loại khỏi tất cả các cơ quan ngoại trừ thận (Athanzio *et al.*, 2008). Hamster được chủng ngừa với các protein LigA có độ dài đầy đủ hoặc tái tổ hợp, sống sót sau khi thử thách với liều chết của *L. interrogans* serovars Copenhageni (Silva *et al.*, 2007) hoặc Pomona (Palaniappan *et al.*, 2006) cho thấy các tính chất miễn dịch bảo vệ của protein tiếp xúc bề mặt này.

Trong khi LigA có khả năng bảo vệ ở những con chuột được tiêm chủng với *L. interrogans* serovar Manilae (Koizumi và Watanabe, 2004), việc sử dụng chuột như mô hình động vật không phải là lý tưởng do khả năng đề kháng với nhiễm trùng *Leptospira*, thể hiện nhu cầu liều tiêm cao để tạo được nhiễm trùng gây chết (Adler và Faine, 1977). Một ưu điểm của chuột nhắt so với

các mô hình hamster là sự sẵn có của gen loại bỏ cho phép phân tích vai trò của các gen vật chủ trong cơ thể (Haake, 2006) và chiến lược thao tác di truyền đối với chuột cống đã được phát triển gần đây (Gibbs *et al.*, 2004). Mặc dù các mô hình chuột nhắt hoặc chuột cống không phản ánh quá trình bệnh ở người nhưng cung cấp các thông tin về cơ chế cư trú ở thận và sức đề kháng vật chủ đối với bệnh leptospirosis (Athanzio *et al.*, 2008; Tucunduva De Faria *et al.*, 2007). Tuy nhiên, giống chuột C3H/HeJ có Toll-4 thiếu hụt gen tỏ ra rất nhạy cảm với những thử thách gây chết của *L. interrogans* serovars Icterohaemorrhagiae, Manilae và Copenhageni (Faine *et al.*, 1999; Nally *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 1998) cho thấy tiềm năng của loại chuột đặc biệt này như một mô hình cho bệnh leptospirosis cấp tính.

Việc sử dụng cá ngựa vằn làm mô hình cho sinh bệnh học *Leptospira* gần đây đã được mô tả. Phôi thai cá ngựa vằn, thường được sử dụng cho các nghiên cứu phát triển phôi cho phép quan sát các tế bào sống dưới kính hiển vi cũng đã được áp dụng cho nghiên cứu sinh bệnh học vi khuẩn (Neely *et al.*, 2002; Swaim *et al.*, 2006). Phôi nhiễm *L. interrogans* được phát hiện thấy không có triệu chứng trong giai đoạn đầu của nhiễm trùng. Các xoắn khuẩn bị thực bào và sống sót bên trong đại thực bào. Những đại thực bào bị nhiễm bệnh này đã được quan sát thấy di chuyển ra khỏi vị trí ban đầu của nhiễm trùng, gợi ý một cơ chế thay thế bằng việc phát tán *Leptospira* có thể dễ dàng hơn (Davis *et al.*, 2009). Mặc dù các nghiên cứu sử dụng cá ngựa vằn có thể cung cấp thông tin về các sự kiện ban đầu của nhiễm trùng *Leptospira*, sự liên quan của mô hình bệnh leptospirosis của con người vẫn chưa được thiết lập.

Việc tiêm *Leptospira* vào các động vật lớn hơn như chó (Faine, 1957) cũng đã được tiến hành, và đã chứng minh được chó là một vật chủ mang trùng. Những con khi nhiễm *Leptospira* bắt chước bệnh leptospirosis nặng ở người, bao gồm xuất huyết phổi (Pereira *et al.*, 2005). Do sự phục vụ lâu dài của chúng như là các mô hình bệnh của con người, chó và động vật linh trưởng

được nghĩ là giống như con người trong sinh lý và chức năng thận, và như vậy là có giá trị trong nghiên cứu sinh lý thận (Haake, 2006) so với các mô hình động vật nhỏ. Tuy nhiên, chi phí của các mô hình này và việc thiếu các công cụ để tạo ra những thay đổi gen đích là một vấn đề. Việc sử dụng các mô hình được xác định rõ ràng là rất cần thiết để hiểu được các khía cạnh sinh bệnh học của *Leptospira*.

2.4. Các công cụ di truyền

Các phương pháp tiếp cận có sẵn đối với các thao tác di truyền *Leptospira* vẫn còn trong giai đoạn đầu so với các loài vi khuẩn khác. Những nỗ lực trước đây để thực hiện các nghiên cứu di truyền cổ điển trên *Leptospira* đã bị cản trở bởi sự vắng mặt của các plasmid tự nhiên trong *Leptospira* gây bệnh và sự phát triển chậm của vi khuẩn trong cả môi trường rắn và lỏng.

Thập kỷ vừa qua đã chứng kiến sự phát triển của các công cụ di truyền để nghiên cứu chức năng các gen của *Leptospira* và việc công bố các trình tự toàn bộ gen của chúng (Bulach *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2004; Picardeau *et al.*, 2008). Sự vắng mặt của plasmid trong các bộ gen của *Leptospira* gây bệnh làm tăng nhu cầu tạo ra vector lắp lại với một phạm vi rộng rãi có thể được sử dụng cho các thử nghiệm di truyền. Với sự phát hiện bacteriophage LE1 nhân bản tái tạo một plasmid vòng tròn trong *L. biflexa* (Saint Girons *et al.*, 1990), một *Escherichia coli*-*L. biflexa* được phát triển vector con thoi, chứa gốc LE1 sao chép và đánh dấu kháng thuốc kháng sinh (Saint Girons *et al.*, 2000). DNA này có thể được đưa vào *Leptospira* bằng phương pháp nhân điện và tái tạo trong *L. biflexa* nhưng không phải là loài gây bệnh (Ko *et al.*, 2009; Saint Girons *et al.*, 2000). Một minh chứng gần đây về sự liên hợp giữa *E. coli* và *Leptospira* spp. sử dụng plasmid RP4 cho thấy một phương pháp khác để đưa DNA vào *Leptospira* (Picardeau, 2008).

Sự đột biến trực giao qua trao đổi allen đã thành công trong việc bất hoạt một số gen, chẳng hạn như gen flagellin (*flaB*),

recA (Tchamedeu Kameni *et al.*, 2002), gen tổng hợp tryptophan (*trpE*) (Bauby *et al.*, 2003), gen tổng hợp heme (*hemH*) (Guégan *et al.*, 2003) và gen sinh tổng hợp methionine (*metX*) (Louvel và Picardeau, 2007) trong *L. biflexa* hoại sinh và *L. meyeri* sử dụng một vector không tái tạo. *L. interrogans* gây bệnh đột biến thiếu adhesin ligB, protein mặt ngoài và adhesin lipL32 hoặc các gen chuyển đổi fliY cũng đã được mô tả (Liao *et al.*, 2009; Croda *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2009). Sự phá vỡ các gen này được thực hiện bằng cách thay thế các trình tự đích bằng gen kháng kháng sinh (kanamycin hoặc spectinomycin) thông qua sự tái tổ hợp đồng nhất (homologous recombination) (Louvel và Picardeau, 2007). Thư viện của các đột biến chèn transposon đã được tạo ra ở các chủng *Leptospira* sử dụng nhân tố Himar1 mariner (Bourhy *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2009). Việc sàng lọc các đột biến *L. biflexa* cho phép xác định gen *fecA* và *feoB*, cũng như xác định đặc tính của chúng trong thu nhận sắt (Louvel *et al.*, 2005). Hệ thống đột biến gen transposon ngẫu nhiên dẫn đến sự hình thành 926 đột biến trong *L. interrogans* serovars Manilae (617), Lai (250), Pomona (17), Copenhageni (9), Canicola (4) và chủng huyết thanh nhóm Canicola serogroup Kito (32) (Murray *et al.*, 2009), trong đó bao gồm các biến thể *lip L32* (Murray *et al.*, 2009) và *loa22* (Ristow *et al.*, 2007). Cả hai gen này đều mã hóa bề mặt các protein tiếp xúc được xem như là các yếu tố độc lực giả định. Trong thư viện transposon cho *L. interrogans* có 712 đột biến trong các vùng mã hóa protein của 551 gen độc nhất (Ko *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2009). Hầu hết những đột biến này đang được chờ đợi xác định kiểu hình.

III. SINH BỆNH HỌC VÀ CÁC YẾU TỐ ĐỘC LỰC

Các cơ chế phân tử của sinh bệnh học của leptospirosis vẫn còn một số điểm chưa rõ ràng vào thời điểm hiện tại. Một số yếu tố ứng viên độc lực đã được xác định có thể tham gia vào sinh bệnh của quá trình nhiễm *Leptospira* và phát sinh bệnh, bao gồm LPS (được coi là yếu tố độc

lực chung của vi khuẩn gram âm), hemolysin, protein màng ngoài (OMP) và các protein bề mặt khác cũng như các phân tử kết dính. Khả năng của hemolysin ly giải hồng cầu và màng tế bào khác làm cho chúng trở thành các yếu tố độc lực tiềm tàng, như đã được chứng minh trong một số mầm bệnh vi khuẩn khác. Một số hemolysin của *Leptospira* đã được xác định khi hoàn thành giải trình tự bộ gen *Leptospira* và công việc hiện đang được tiến hành để xác định chức năng của chúng. Các chỉnh hình của protein hemolysin Tly, các yếu tố độc lực được công nhận trong xoắn khuẩn *Brachyspira hyodysenteriae* (Ter Huurne *et al.*, 1994) được tìm thấy trong *L. interrogans*.

Các đặc tính của TlyB và TlyC bề mặt đã chứng minh rằng các protein này của *Leptospira* không thể hiện tính chất hemolysin nhưng TlyC đã được tìm thấy để liên kết các thành phần matrix ngoại bào (ECM) (Carvalho *et al.*, 2009). Sprialomyelinase C được tinh chế từ *L. interrogans* serovar Pomona gây ra sự phân giải hồng cầu của cừu (Berheimer và Bey, 1986). Gen spomyomyelinase C (*sphA*) cũng được tìm thấy trong *Leptospira* gây bệnh khác là *L. borgpeterenii* serovar Hardjo và protein biểu hiện hoạt động sprialomyelinase (Segers *et al.*, 1992). Các gen mã hóa hemolysin được tìm thấy trong *L. interrogans* serovar Lai bao gồm một số chất tương đồng *sphA*, *sphH*, mã hóa một protein hình thành lỗ nhỏ mà không có hoạt tính sprialomyelinase hoặc phospholipase (Lee *et al.*, 2002 và 2000) và *sph2*, sản phẩm protein của nó gây ra sự hư hỏng tế bào nội mô và tế bào hồng cầu (Artiushin *et al.*, 2004).

SphH và *sph2* đều thể hiện trong người nhiễm *Leptospira* (Carvalho *et al.*, 2010) và tính gây độc tế bào đã được chứng minh (Lee *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2008). Một nhóm khác đã bác bỏ tính chất tán huyết của cả hai *sphH* và *sph2* (Carvalho *et al.*, 2010); tuy nhiên sự chênh lệch về kết quả của họ có thể là do sự gấp khúc khác nhau hoặc các tính chất khác của các protein tái tổ hợp sử dụng cho các xét nghiệm. Vai trò trực tiếp của sprialomyelinase

trong sinh bệnh học vẫn chưa rõ ràng; sự vắng mặt của gen sphingomyelinase trong *Leptospira* hoại sinh (Bulach *et al.*, 2006) đề xuất các chức năng có thể gây độc hại (Adler và Moctezuma, 2010) hoặc đơn giản là khả năng sống sót trong môi trường động vật có vú, trong đó một số chất dinh dưỡng quan trọng (ví dụ sắt) bị giới hạn.

Sự kết dính của *Leptospira* với các thành phần mô chủ được coi là bước khởi đầu và cần thiết cho nhiễm trùng và sinh bệnh học. Việc gắn vào các tế bào chủ và các thành phần ECM có thể là cần thiết cho khả năng xâm nhập, phân bố và tồn tại của *Leptospira* trong các mô chủ của động vật có vú. Giống như các mầm bệnh vi khuẩn khác, *Leptospira* tạo ra các thành phần bề mặt nhận dạng các phân tử matrix kết dính có thể làm trung gian xâm lấn vật chủ (Patti *et al.*, 1994; Schwarz-Linek *et al.*, 2004). Người ta đã chứng minh rằng *L. interrogans* liên kết với nhiều dòng tế bào, bao gồm nguyên bào sợi, bạch cầu đơn nhân/đại thực bào, tế bào nội mô, tế bào biểu mô phát triển trong ống nghiệm (Breiner *et al.*, 2009). Mặc dù được xác định rõ ràng các thành phần ECM đóng vai trò trong sự tương tác của mầm bệnh với các phân tử vật chủ nhưng dữ liệu gần đây cho thấy *Leptospira* gây bệnh liên kết các tế bào chủ hiệu quả hơn (Breiner *et al.*, 2009). Thập kỷ qua chứng kiến sự xác định của cả tế bào chủ và chất nền ECM cũng như các phân tử bám dính *Leptospira* được bao hàm trong tương tác này.

Hiện tại, phân tích in silico và các kỹ thuật thí nghiệm (ví dụ phân đoạn Triton X-114, miễn dịch huỳnh quang bề mặt, biotinylation bề mặt và xét nghiệm ái lực màng) có thể được sử dụng để xác định các protein tiếp xúc bề mặt của *Leptospira* có thể có vai trò tiềm năng trong độ bám dính *Leptospira* và sinh bệnh học (Pinne và Haake, 2009). Tóm lại, các tiếp cận này đã thành công trong việc mô tả đặc điểm OmpL36, OmpL37, OmpL47 và OmpL54 mới được xác định nhưng chức năng của các protein này vẫn chưa được biết.

Các protein bề mặt ngoài của *Leptospira* là các chất kết dính tốt vì phân nửa thể hiện bề

mặt của chúng. Các *Leptospira* gây bệnh biểu hiện một số protein ít nhất là một phần bề mặt, bao gồm LigA, LigB và LigC, có chứa các miền giống như immunoglobulin của vi khuẩn (Matsunaga *et al.*, 2003; Palaniappan *et al.*, 2002). Các protein vi khuẩn khác với miền này được biết đến chất kết dính, chẳng hạn như intimin trong *E. coli* (Luo *et al.*, 2000) và invasins trong *Yersinia pseudotuberculosis* (Hamburger *et al.*, 1999). Cả LigA và LigB liên kết các thành phần ECM, chẳng hạn như elastin, tropoelastin, collagens I và IV, laminin và đặc biệt là fibronectin (Choy *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2009). Liên kết fibronectin được điều chỉnh bởi calci và tương tác này được điều hòa bởi ba motif trong LigB (Victoriano *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009; Lin và Chang, 2007-2008). Tuy nhiên, việc loại bỏ gen *ligB* không ảnh hưởng đến độc lực hoặc sự xâm lấn trong hamster bị nhiễm cấp tính hoặc chuột bị nhiễm bệnh mạn tính (Croda *et al.*, 2008). Điều này cho thấy sự hiện diện của các protein khác có khả năng tương tác tương tự với vật chủ, đặc biệt là LigA có những chức năng chồng chéo hoặc dư thừa.

Một số protein *L. interrogans* đã được hiển thị để liên kết với thành phần laminin ECM. Một trong những protein liên kết với laminin là Lsa24/LfhH hoặc LenA, cũng được chứng minh là liên kết với yếu tố bổ sung H, yếu tố liên quan đến protein-1, fibrinogen và fibronectin (Barbosa *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2006). Đó là một họ protein giống như endostatin (Len), những protein khác thuộc nhóm này (LenB, C, D, E, F) cũng liên kết với fibronectin (Stevenson *et al.*, 2007). Các protein *Leptospira* khác được xác định là có đặc tính gắn kết với laminin bao gồm Lsa21 (Atzingen *et al.*, 2008), Lsa27 (Longhi *et al.*, 2009), Lsa63 (Vieira *et al.*, 2010) và protein màng 36-kDa (Merien *et al.*, 2000). Cả Lsa27 và Lsa63 đều tiếp xúc bề mặt và phản ứng với các mẫu huyết thanh từ bệnh nhân leptospirosis (Longhi *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2010) cho thấy vai trò có thể của chúng trong sự bám dính của vật chủ và sinh bệnh học, nhưng điều này vẫn cần được xác định bằng thực nghiệm. Hiện tại, vẫn chưa rõ liệu tất cả các protein này có

tương tác với laminin *in vivo* dưới điều kiện sinh lý hay không, và đây sẽ là một câu hỏi chìa khóa để tiếp tục khám phá trong tương lai.

Lipoprotein 32-kDa LipL32 được bảo tồn cao ở các loài gây bệnh, không có trong các căn nguyên không gây bệnh và biểu hiện trong quá trình nhiễm trùng ở người (Haake *et al.*, 2000). OMP của *Leptospira* này kết dính collagens I, IV và V cũng như laminin (Haake *et al.*, 2000; Hauk *et al.*, 2008; Hoke *et al.*, 2008). LipL32 cũng thể hiện một hoạt tính liên kết với fibronectin phụ thuộc calci (Hauk *et al.*, 2008; Tung *et al.*, 2010). Đáng ngạc nhiên là các đột biến *lipL32* được xây dựng bằng cách sử dụng đột biến transposon không khác biệt với *Leptospira* gây bệnh hoang dại về hình thái, tốc độ tăng trưởng hoặc liên kết với ECM và không bị giảm độc trong các mô hình động vật (Murray *et al.*, 2009). Một lần nữa câu hỏi về sự dư thừa chức năng sẽ rất quan trọng nhưng đây thách thức cần được giải quyết.

Loa22 - yếu tố độc lực được mô tả về di truyền đầu tiên trong *Leptospira* (Ristow *et al.*, 2007) là một lipoprotein có kiểu gắn peptidoglycan tương tự OmpA (Koizumi và Watanabe, 2003) và không được điều tiết trong quá trình nhiễm *Leptospira* cấp tính (Nally *et al.*, 2007). Nó được bảo tồn cao trong số *Leptospira* gây bệnh, hỗ trợ vai trò trong sinh bệnh học; tuy nhiên chức năng của Loa22 vẫn chưa được biết đến. Một đột biến *loa22* thu được thông qua sinh đột biến transposon đã giảm độc trên cả mô hình chuột lang và chuột hamster của bệnh leptospirosis. Độc lực được phục hồi khi bổ sung vi khuẩn đột biến (Ristow *et al.*, 2007). Đột biến được thể hiện bề mặt và được công nhận bởi huyết thanh thu được từ bệnh nhân leptospirosis (Gamberini *et al.*, 2007). Cùng với nhau, tất cả các kết quả này cho thấy Loa22 là một ứng cử viên tốt để phát triển vắc xin và cho các nghiên cứu về chức năng của protein ở mức phân tử.

Sự tiếp xúc của *L. interrogans* *in vitro* với điều kiện nhiệt độ và thẩm thấu bất thường môi trường vật chủ dẫn đến sự thay đổi biểu hiện của nhiều gen (Lo *et al.*, 2006-2009; Matsunaga *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2006). Trong các chủng

độc lực, *ligA* và *ligB* được điều hòa ở mức độ thâm thấu sinh lý (đôi với hầu hết các mô của động vật có vú) (Choy *et al.*, 2007; Lo *et al.*, 2009; Matsunaga *et al.*, 2005) trong khi biểu hiện sẽ bị mất đi khi các chủng được nuôi cấy giảm độc (Matsunaga *et al.*, 2003). Tương tự, sự biểu hiện của gen *sph2* - yếu tố độc lực giả định khác đã được tạo ra (Lo *et al.*, 2009) trong khi gen *lipL36* - protein bề mặt ngoài bị ức chế (Lo *et al.*, 2009; Nally *et al.*, 2001) ở mức độ thâm thấu sinh lý. Tuy nhiên, hầu hết các gen biểu hiện khác nhau mã hóa cho các protein giả định có chức năng chưa biết (Lo *et al.*, 2006). Điều thú vị là nhiều protein bề mặt được điều chỉnh ở nhiệt độ sinh lý (Lo *et al.*, 2009) có thể là một cơ chế mà mầm bệnh trốn tránh hệ thống miễn dịch của vật chủ. Những nghiên cứu DNA này đã chứng minh khả năng của các *Leptospira* gây bệnh để thích nghi với sự thay đổi từ điều kiện môi trường sang sinh lý, điều này có thể tạo điều kiện cho sự xâm lấn và thiết lập bệnh ở vật chủ.

IV. ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA VẬT CHỦ ĐỐI VỚI *LEPTOSPIRA*

Cơ chế đề kháng với leptospirosis phần lớn bởi đáp ứng dịch thể (Levett, 2001; Ko *et al.*, 2009; Adler và Faine, 1977). Tương tự như các vi khuẩn gram âm khác, các kháng thể được tạo ra trong quá trình nhiễm leptospirosis có khả năng ngưng kết (Jost *et al.*, 1986). Kháng thể IgM và IgG được phát hiện ở những bệnh nhân đã hồi phục sau nhiễm leptospirosis nặng đến 6 năm sau khi nhiễm *Leptospira* đầu tiên (Cumberland *et al.*, 2001). Các kháng thể được tạo ra chủ yếu là chống lại LPS của *Leptospira*. Các kháng thể đơn dòng chống lại LPS *Leptospira* từ những con chuột bị nhiễm bệnh đã bảo vệ thụ động cho chuột lang mới sinh chống lại nhiễm trùng thực nghiệm (Jost *et al.*, 1986).

Tuy nhiên, khả năng miễn dịch kháng thể kháng LPS chỉ giới hạn ở các serovar tương đồng, không giống như các chế phẩm protein *Leptospira* toàn phần, thể hiện sự bảo vệ khi công cường độc với cả serovar *Leptospira* tương đồng và dị hợp (Palaniappan *et al.*, 2007).

Các OMP *Leptospira* OmpL1 và LipL41 là các kháng thể miễn dịch khi được sử dụng kết hợp (Haake *et al.*, 1999), điều này hứa hẹn trong việc phát triển vaccin tiểu đơn vị với tác dụng bảo vệ lớn hơn và ít tác dụng phụ hơn. Các protein tiếp xúc bề mặt khác có các đặc tính bảo vệ miễn dịch tiềm năng nhưng việc thử nghiệm chúng chỉ bị giới hạn ở một số ít. Ví dụ tiêm chủng với các vùng LigB bảo tồn và thay đổi, tiếp đến thử thách với *L. interrogans* serovar Pomona đã tạo ra một phản ứng bảo vệ ở hamster (Yan *et al.*, 2009). Việc xác định các kháng nguyên bảo vệ khác liên quan đến miễn dịch đối với bệnh leptospirosis cũng sẽ sớm phát hiện *Leptospira* thông qua việc phát triển các phương pháp chẩn đoán cải tiến.

Sự hiện diện của cả TLR2 và TLR4 là cần thiết để tạo bảo vệ miễn dịch bẩm sinh hiệu quả chống lại *Leptospira* (Chassin *et al.*, 2009; Nahori *et al.*, 2005; Viriyakosol *et al.*, 2006; Werts *et al.*, 2001). Chuột nhắt có gen bị loại trừ kép (không có cả TLR2 và TLR4) rất dễ bị nhiễm *Leptospira* so với loại trừ đơn (Chassin *et al.*, 2009). Tuy nhiên sự vắng mặt của TLR4 sẽ dẫn đến bệnh leptospirosis nghiêm trọng hơn với các hội chứng lâm sàng của bệnh vàng da và xuất huyết phổi cũng như sự tích tụ của *Leptospira* ở thận và phổi ở những con chuột bị nhiễm *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae (Viriyakosol *et al.*, 2006). LPS thường kích hoạt con đường TLR4 để đáp ứng với vi khuẩn gram âm, đã có thể hoạt hóa con đường TLR2 trong các dòng đơn bào của con người (Werts *et al.*, 2001).

Những con chuột bị thiếu TLR2 đã không đáp ứng với việc tiêm LPS trong màng bụng, không thể tạo ra TNF- α và IL-6. Những kết quả này cho thấy có thể có những khác biệt cơ bản trong cách các loài khác nhau phản ứng với *Leptospira*. Bằng chứng ủng hộ giả thuyết này là trong khi TLR4 đơn bào người không được kích hoạt bởi LPS hoặc *Leptospira* đã bị diệt bởi nhiệt (Werts *et al.*, 2001) thì những con chuột bị thiếu TLR4 được tiêm *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae vào màng bụng đã thể

hiện bệnh leptospirosis nghiêm trọng. Nahori *et al.* (2005) đã chứng minh rằng lipid A của *Leptospira* bị biến đổi nhiều so với các lipid A của vi khuẩn gram âm khác. Mặc dù có các đặc tính không điển hình, lipid A của *Leptospira* có thể được nhận dạng bằng TLR4 của các tế bào chuột. Sự hiện diện của TLR4 được chứng minh là cần thiết cho việc sản xuất sớm IgM bởi các tế bào B để đáp ứng với LPS của *Leptospira* (Chassin *et al.*, 2009).

Sự khác biệt về kết quả của nhiễm trùng *Leptospira* giữa chuột nhắt và con người đã dẫn đến các nghiên cứu nhằm có được sự hiểu biết tốt hơn về các cơ chế xâm lấn và đề kháng bệnh leptospirosis. Sự khác biệt trong việc tạo ra một phản ứng miễn dịch hiệu quả chống lại *Leptospira* gây bệnh giữa động vật mang trùng và các vật chủ tình cờ có thể góp phần ngăn chặn nhiễm trùng sớm. Bởi vì sự nhận biết *Leptospira* trong các tế bào loài chuột được trung gian bởi cả hai thụ thể TLR4 và TLR2, trong khi chỉ TLR2 được kích hoạt trong tế bào người bằng tín hiệu LPS (Nahori *et al.*, 2005; Werts *et al.*, 2001). Người ta cho rằng lipid A của *Leptospira* không được nhận ra bởi TLR4 của con người và do đó không thể kích hoạt con đường miễn dịch này. Việc thiếu sự nhận ra lipid A của *Leptospira* trong các tế bào con người nhưng không phải trong các tế bào chuột có thể dẫn đến thất bại trong việc đưa các phản ứng thích hợp dẫn đến tính nhạy cảm của bệnh leptospirosis. Liệu phản ứng với một LPS cụ thể có khác nhau giữa động vật mang trùng và vật chủ tình cờ đối với các *Leptospira* khác hay không chưa được mô tả.

Các đại thực bào được chứng minh là thực bào có hiệu quả *Leptospira in vivo* (Vinh *et al.*, 1982) và *in vitro* (Levett, 2001), mặc dù trong quá trình lây nhiễm các vi sinh vật này chưa được làm sạch. Gần đây, Li *et al.* (2010) đã chứng minh rằng *L. interrogans* chủng Lai liên kết và xâm nhập vào cả đại thực bào ở người và chuột với cùng hiệu quả, nhưng số phận nội bào của mầm bệnh thực bào này khác nhau. Trong các đại thực bào ở chuột, các *Leptospira* đã

được quan sát để cư trú trong lysosome thông qua quá trình đồng hóa nội địa với marker LAMP-1 endosom và đã bị thoái hóa bởi thủy phân lysosom. Ngược lại, *Leptospira* được thực bào bởi đại thực bào của con người có thể thoát khỏi phagosome vào cytosol, nơi chúng sinh sôi nảy nở và kích hoạt apoptosis. TLR4 không có khả năng phát hiện *Leptospira* và sự thoát khỏi phagosome của *Leptospira* đề xuất các cơ chế có thể mà *Leptospira* phá vỡ hệ thống miễn dịch của con người. Các nghiên cứu sâu hơn để xác định vai trò cụ thể của vật chủ và các yếu tố vi sinh vật khác trong sự khác biệt giữa các biểu hiện bệnh ở người và chuột cần được đảm bảo.

V. KẾT LUẬN VÀ VIỄN CẢNH TƯƠNG LAI

Nhiễm trùng *Leptospira* có thể dẫn đến các biến chứng của hệ thống đa cơ quan hoặc thậm chí tử vong ở các vật chủ tình cờ như con người trong khi chỉ gây ra nhiễm trùng mạn tính nhẹ đến không triệu chứng ở động vật mang trùng như gặm nhấm (Adler và Moctezuma, 2010; Vijayachari *et al.*, 2008). Người ta cho rằng sự khác biệt trong phản ứng miễn dịch của vật chủ có thể dẫn đến kết quả bệnh khác nhau (Nahori *et al.*, 2005), tuy nhiên các cơ chế liên quan chưa được thiết lập. Với sự sẵn có của các mô hình động vật của bệnh leptospirosis cấp tính và mạn tính, và các mô hình chuột bị loại một số gen; các nghiên cứu về sinh hóa và di truyền có thể được sử dụng để có sự hiểu biết tốt hơn về sự xâm nhập của vật chủ và khả năng chống lại bệnh leptospirosis nặng. Những tiếp cận này cho phép xác định hai yếu tố quyết định: vật chủ và yếu tố mầm bệnh đều có liên quan đến tính nhạy cảm với bệnh.

Những tiến bộ chính trong di truyền của *Leptospira* đã đạt được gồm việc xác định toàn bộ trình tự bộ gen của *Leptospira*, phát triển các công cụ như vector con thoi, hệ thống gây đột biến gen và transposon. Tuy nhiên, những trở ngại trong thử nghiệm di truyền trong các *Leptospira* gây bệnh vẫn còn, chẳng hạn như không có plasmid sao chép và sự phát triển chậm của vi khuẩn. Mặc dù các phương pháp tạo đột biến *L.*

interrogans hiệu quả hơn vẫn đang trên đà phát triển, việc sử dụng vi khuẩn *L. biflexa* như một sinh vật mẫu cho phép mô tả đặc điểm chức năng của các gen phổ biến đối với cả *Leptospira* sống tự do và gây bệnh.

Những tiến bộ gần đây dẫn đến việc tạo ra các *Leptospira* đột biến cho phép phân tích chức năng của các yếu tố độc lực giả định. Trong khi điều này đã thiết lập Loa22 như là yếu tố độc lực di truyền đầu tiên được xác định (Ristow *et al.*, 2007); đáng tiếc là sự gián đoạn của *lipL32* và *ligB* đã không thay đổi sự lây nhiễm của các *Leptospira* đột biến trong các mô hình động vật đã được thử nghiệm (Croda *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2009). Điều này có thể chỉ ra rằng ít nhất một số protein liên quan đến sinh bệnh học có thể có chức năng chồng chéo. Các kỹ thuật bổ sung như tạo ra các thể hệ loại bỏ gen trực tiếp có thể được sử dụng, cho phép đánh giá đồng thời các yếu tố độc lực ứng viên liên quan trong quá trình nhiễm trùng của *Leptospira* gây bệnh.

Trong tương lai, nghiên cứu *Leptospira* có thể bao gồm ứng dụng proteomics cùng với các phương pháp di truyền học để thiết lập mẫu biểu hiện của các yếu tố độc lực giả định. Phân tích proteome toàn cầu gần đây của *L. interrogans* sử dụng khối phổ và điện di trên gel 2D, cho thấy 65 trong số 563 protein của *Leptospira* gây bệnh được xác định thay đổi biểu hiện khi *Leptospira* được nuôi cấy trong các điều kiện bất chước môi trường vật chủ (Eshghi *et al.*, 2009). Sự cảnh báo của công việc này cũng như những phát hiện của Lo *et al.* (2006) về biểu hiện protein của *Leptospira* ở trong *L. interrogans* serovar Lai bị thay đổi với sự thay đổi nhiệt độ là ảnh hưởng của các yếu tố môi trường cụ thể được đánh giá, do đó không nắm bắt được các điều kiện chính xác trong quá trình nhiễm trùng vật chủ ở thể cấp tính hoặc mạn tính. Điều này vẫn còn vô cùng khó khăn về mặt kỹ thuật. Monahan *et al.* (2008) thực hiện phân tích proteome của *L. interrogans* serovar Copenhageni phân lập từ nước tiểu của chuột bị nhiễm bệnh mạn tính và so sánh với các *Leptospira* giảm độc được nuôi cấy *in vitro* đã chứng minh sự khác biệt trong hồ sơ protein giữa hai nhóm.

Leptospira tiết qua thận vào nước tiểu có độc lực cao và có thể biểu hiện các protein cần thiết cho quá trình sinh bệnh. Gần đây, sử dụng kỹ thuật quang phổ khối, Malstrom *et al.* (2009) đã có thể chứng minh rằng *L. interrogans* duy trì nồng độ proteome không đổi. Phơi nhiễm *Leptospira* với ciprofloxacin dẫn đến sự gia tăng số lượng protein không biểu hiện một cách bình thường với sự giảm tương ứng trong biểu hiện protein phong phú. Tất cả những nghiên cứu này cho thấy biểu hiện protein khác biệt của *Leptospira* gây bệnh khi ở bên ngoài vật chủ cũng như trong quá trình xâm nhập, xâm chiếm và tồn tại trong cơ thể vật chủ. Nghiên cứu thêm về hồ sơ biểu hiện protein của *Leptospira* khi vi khuẩn này di chuyển từ các học môi trường đến các mô chủ khác nhau sẽ cung cấp thông tin về các yếu tố liên quan đến quá trình xâm chiếm, dẫn đến sự thiết lập và thời gian tồn tại của nhiễm trùng trong cơ thể vật chủ.

Một thách thức lớn là việc áp dụng nghiên cứu cơ bản để cải thiện chẩn đoán và phát triển vaccin. Các xét nghiệm chẩn đoán có sẵn không phải lúc nào cũng đặc hiệu serovar, bởi vì phản ứng chéo với các serovar khác nhau có thể xảy ra giữa các sinh vật trong cùng một nhóm huyết thanh. Sự khác biệt có thể có trong cơ chế gây bệnh giữa các chủng khác nhau vẫn còn phải được khám phá. Bởi vì sự biểu hiện ban đầu của bệnh leptospirosis có thể khó nhận ra từ một số bệnh truyền nhiễm khác, chẩn đoán nhanh và chính xác là điều cần thiết để ngăn chặn sự tiến triển của dạng bệnh nghiêm trọng hơn, đặc biệt là ở các nước đang phát triển. Hiện tại không có vaccin có sẵn rộng rãi chống lại bệnh leptospirosis để sử dụng trên người. Các yếu tố độc lực đã quan sát được điều chỉnh trong quá trình lây nhiễm như OMP với tiếp xúc bề mặt, như LigA và LigB, đang được coi là mục tiêu khả thi cho sự phát triển của vaccin. Với đầu ra nghiên cứu *Leptospira* mạnh mẽ như hiện nay, trong tương lai gần chúng ta có thể thấy sự phát triển của các hệ thống chẩn đoán đơn giản và rẻ tiền thích hợp cho các khu vực nghèo đặc hữu, nghèo tài nguyên, cũng như ứng dụng các công nghệ tiên tiến vào phát triển vaccin./.