

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

HỌC VIỆN QUÂN Y

NGUYỄN THỊ TUẤN

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO IgG
KHÁNG VI RÚT *COLTI* NHÓM B HỌ *REOVIRIDAE*
CHO BỘ SINH PHẨM ELISA SANDWICH**

Chuyên ngành : Vi rút học

Mã số : 62.72.68.05

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI – 2010

CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI:
HỌC VIỆN QUÂN Y

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. PHAN THỊ NGÀ
2. TS. NGUYỄN VĂN VIỆT

Phản biện 1: GS.TSKH. Nguyễn Văn Dịp

Phản biện 2: GS.TSKH. Nguyễn Thu Vân

Phản biện 3: PGS.TS. Đoàn Huy Hậu

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm Luận án cấp Nhà nước
họp tại Học viện Quân y

Vào hồi 9 giờ 00 ngày 18 tháng 09 năm 2010.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia
- Thư viện Y học Trung ương
- Thư viện Học viện Quân y

CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Phan Thị Ngà, Nguyễn Thanh Thủy, Bùi Minh Trang, Nguyễn Thi Tuấn, Đặng Tuấn Đạt** (2007), “Phát hiện một thành viên vi rút thuộc họ *Reoviridae* gây hội chứng não cấp ở tỉnh Gia lai, 2005”, *Tạp chí Y học dự phòng*, 14 (6), tr. 24-28.
2. **Nguyễn Thanh Thủy, Bùi Minh Trang, Nguyễn Thi Tuấn, Phan Thị Ngà** (2008), “Đặc điểm hình thái và sự nhân lên của vi rút Banna trên tế bào muỗi *Aedes albopictus* dòng C6/36”, *Tạp chí Y học dự phòng*, 98 (7), tr. 35-40.
3. **Nguyễn Thi Tuấn, Phan Thị Ngà** (2009), “Nghiên cứu chế tạo IgG thổ kháng vi rút Banna chủng 05VN255 gắn enzyme Horseradish Peroxidase”, *Tạp chí Y học thực hành*, Bộ Y tế, 678 (9), tr. 31-33.
4. **Nguyễn Thi Tuấn, Bùi Minh Trang, Đỗ Phương Loan, Nguyễn Việt Hoàng, Lê Thị Hiền Thu, Phan Thị Ngà** (2009), “Xác định sự lưu hành của vi rút Banna ở Việt Nam và thử nghiệm chế tạo kháng thể kháng vi rút”, *Tạp chí Y học dự phòng*, 19 (8), tr. 15- 18.
5. **Nguyễn Thi Tuấn, Nguyễn Văn Việt, Phan Thị Ngà** (2010), “Áp dụng kỹ thuật ELISA Sandwich để định loại virus Colti nhóm B (virus Banna) ở Tây Nguyên”, *Tạp chí y học dự phòng*, 5 (113), tr. 36- 41.

MỞ ĐẦU

Viêm não là một bệnh truyền nhiễm cấp tính, triệu chứng lâm sàng nặng nề, tỷ lệ tử vong cao, 70% bệnh để lại di chứng ảnh hưởng đến sức khoẻ và khả năng lao động của bệnh nhân, chi phí cho một ca bệnh cao... Trong số những vi rút gây hội chứng não cấp (HCNC) và sốt không rõ nguyên nhân ở Châu Á, năm 2005 tại Việt Nam phân lập được một chủng vi rút mới từ dịch não tuỷ bệnh nhân HCNC ở tỉnh Gia Lai, Tây Nguyên bằng tế bào muỗi *Aedes albopictus* dòng C6/36. Chủng vi rút này có ký hiệu là 05VN255 và được xác định là vi rút *Colti* nhóm B, cùng nhóm gien với vi rút Banna phân lập ở Trung Quốc từ năm 1987. Đây là chủng vi rút thuộc họ *Reoviridae* đầu tiên được phân lập từ bệnh nhân HCNC ở Việt Nam. Là một vi rút mới được phát hiện nên nhu cầu cần có sinh phẩm chẩn đoán là điều cần thiết, do nhu cầu thực tiễn trên chúng tôi thực hiện đề tài “Nghiên cứu chế tạo IgG kháng vi rút *Colti* nhóm B họ *Reoviridae* cho bộ sinh phẩm ELISA Sandwich" với mục tiêu:

1. Chế tạo IgG thử kháng vi rút *Colti* nhóm B chủng 05VN255 và bộ sinh phẩm ELISA Sandwich chẩn đoán vi rút *Colti* nhóm B (vi rút Banna - BAV).
2. Đánh giá sự ổn định, hiệu quả phát hiện vi rút *Colti* nhóm B (vi rút Banna - BAC) của bộ sinh phẩm ELISA Sandwich.

Những đóng góp mới của luận án:

- Chế tạo thành công kháng thể IgG kháng vi rút *Colti* nhóm B (một vi rút mới phát hiện và gây bệnh ở Việt Nam) và cộng hợp IgG gắn enzym HRPO.
- Góp phần hoàn thiện bộ sinh phẩm ELISA Sandwich chẩn đoán vi rút *Colti* nhóm B, một trong những vi rút mới phát hiện gần đây ở Việt Nam. Bước đầu giám sát phát hiện thấy sự xuất hiện của vi rút ở một số tỉnh thành trong cả nước.

Bố cục của luận án:

Luận án được trình bày trong 110 trang, gồm có 4 chương và 110 tài liệu tham khảo (bao gồm 27 tài liệu tiếng Việt, 83 tài liệu tiếng Anh)

Đặt vấn đề: 2 trang; Chương 1: Tổng quan tài liệu: 34 trang; Chương 2: Đối tượng, vật liệu và phương pháp nghiên cứu: 20 trang; Chương 3: Kết quả nghiên cứu: 28 trang; Chương 4: Bàn luận: 24 trang; Kết luận: 1 trang; Kiến nghị: 1 trang.

CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN

1.1. Vi rút Colti

1.1.1. Hình thể, cấu trúc

Vi rút *Colti* có vỏ capsid và lõi là ARN, không có bao ngoài. Các virion hình cầu với nhiều mặt đối xứng, đường kính khoảng 80 nm, virion được phát hiện bằng phương pháp nhuộm âm bản. Bề mặt vi rút có các gai, vật liệu di truyền của vi rút là ARN sợi kép (ds ARN), có 12 phân đoạn ký hiệu là Seg-1 đến Seg-12, trọng lượng phân tử là $2,5 \times 10^6$ Kdal. Chiều dài vật liệu di truyền (genome) của BAV và KDV là 21 Kb, chiều dài các phân đoạn dao động trong khoảng từ 862 bp đến 3.747 bp. Các protein được sắp xếp trong các lớp đồng tâm, theo cấu trúc đối xứng của vi rút. Vi rút *Colti* nhóm B có 7 protein cấu trúc, 5 trong số đó ở lõi. Lớp capsid ngoài chứa protein VP4 và VP9. Bao quanh lõi vi rút có 3 protein cấu trúc chính là VP2 (subcore shell), VP8 (core-surface layer), VP10 và có 2 protein phụ là VP1, VP3.

1.1.2. Quá trình nhân lên của vi rút

Quá trình nhân lên của vi rút xảy ra trong bào tương tế bào chủ: Vi rút bám vào các thụ thể ở bề mặt tế bào cảm thụ nhờ một protein ở lớp capsid ngoài. Sự xâm nhập của chúng còn chưa được biết rõ. Các tác giả cho rằng chúng vào tế bào theo cơ chế ẩm bào và qua sự hình thành các lỗ hình ống màng tế bào. Sau khi vào trong bào tương tế bào, vi rút được cởi vỏ trong lysosome. ARN sợi âm được dùng làm khuôn để sao chép ARN sợi dương (ARNm) nhờ enzyme ARN polymerase phụ thuộc ARN của vi rút. Sợi dương này dùng để tổng hợp các protein, đồng thời phiên mã tạo ARN sợi âm (các đoạn ARN sợi kép hay các ARN đơn sợi âm không bao giờ tồn tại tự do trong các tế bào nhiễm). Quá trình sao mã và dịch mã lúc đầu đã tạo nên các protein sớm của vi rút nhờ các enzyme ARN polymerase phụ thuộc ARN, ARN triphosphatase, guanyltransferase (cap), methyltransferase và helicase. Giai đoạn tiếp theo là quá trình tổng hợp protein capsid của vi rút. Quá trình sao chép từ sợi mạch (-) và sợi mạch (+) của ARN tạo nên genome của vi rút. Sau khi các thành phần được tổng hợp sẽ lắp ráp thành vi rút mới, vi rút thoát ra ngoài do phá huỷ tế bào và xâm nhập tế bào cảm nhiễm mới.

1.1.3. Đặc điểm kháng nguyên

Tại Trung Quốc, Việt Nam và Indonesia đã phân lập được các chủng (genotype) vi rút *Colti* nhóm B như sau: (1) ở Trung Quốc: *M14*, *HN59*, *HN131*, *HN199*, *HN295*, *Banna*, *Sx-44*; (2) ở Việt Nam: *02VN018b*, *02VN178b*, *02VN009b*, *02VN078b*, *02VN180b*; (3) ở Indonesia: *JKT- 6423*, *JKT- 6969*,

JKT- 7041, JKT- 7075; (4) Riêng *JKT- 7075* có 2 dưới týp là *JKT- 7075 B1-S & B2-R*.

1.1.4. Bệnh sinh

Vi rút xâm nhập vào người qua da do muỗi đốt, khi vi rút vào người, nó sẽ được nhân lên trong hệ bạch huyết, các virion được di chuyển một cách thụ động qua nội mô của mạch máu hoặc qua đám rối màng mạch, sau đó vào hệ thần kinh trung ương gây tổn thương các vi mạch, làm xuất huyết vi thể ở não, cuối cùng vi rút tồn tại ở trong dịch não tủy. Trẻ em khi nhiễm vi rút, bị bệnh nặng có thể dẫn tới tử vong, do tổn thương hệ thần kinh trung ương như bị viêm não, viêm màng não, viêm não- màng não. Đối với phụ nữ có thai, nhiễm vi rút có thể gây xảy thai và nếu khỏi thì khi sinh có thể làm cho trẻ sơ sinh bị sốt.

1.1.5. Lâm sàng

1.1.5.1. Triệu chứng lâm sàng

Khi bệnh nhân bị nhiễm vi rút *Colti* nhóm B sẽ gây viêm não, thể điển hình được mô tả như sau:

Thời kỳ khởi phát: kéo dài 1-2 ngày (tuy nhiên cũng khó xác định khi bệnh nhân không nhớ) với triệu chứng sốt cao đột ngột, ớn lạnh, đau đầu, đau cơ khớp, chán ăn. Thời kỳ toàn phát: sau 3-6 ngày, bệnh nhân sốt rất cao có thể mê sảng, rối loạn thần kinh thực vật, dấu hiệu cứng gáy, thờ ơ với ngoại cảnh, khó thở, sợ ánh sáng, chán ăn, buồn nôn, có thể hôn mê. Các triệu chứng tổn thương thần kinh ngoại vi như liệt, múa vờn, múa giật... Giai đoạn này nếu không cấp cứu và chữa trị kịp thời bệnh nhân dễ tử vong nhất. Thời kỳ tiến triển bán cấp: từ ngày thứ 7-9, các triệu chứng giảm như tình trạng sốt giảm, mạch nhiệt ổn định, hội chứng thần kinh trung ương và ngoại vi giảm. Tuy nhiên thời kỳ này cần phải chú ý các biến chứng như viêm phổi, loét, nhiễm khuẩn tiết niệu, táo bón... do nằm lâu. Thời kỳ hồi phục: bệnh nhân còn sốt nhẹ, tỉnh táo dần, có cảm giác thèm ăn, chỉ còn lại các di chứng tùy thuộc vào mức độ nặng nhẹ của bệnh như: liệt, xuất huyết, viêm cơ tim, viêm màng ngoài tim, trí nhớ kém.

1.1.5.2. Điều trị

Cho đến nay chưa có thuốc điều trị đặc hiệu cho nhiễm vi rút *Colti*, chủ yếu là điều trị triệu chứng, phòng và hạn chế biến chứng. Vấn đề chăm sóc và tăng cường nuôi dưỡng đóng vai trò quan trọng cho sự bình phục của bệnh nhân sau nhiễm vi rút.

1.1.6. Dịch tễ học

Tỷ lệ nhiễm vi rút và mắc bệnh phân bố theo mùa, số ca bệnh có thể dao động nhẹ từ năm này qua năm khác phụ thuộc vào thời tiết vì có liên quan đến mật độ muỗi.

1.1.6.1. Cơ chế lây truyền

Từ các loài muỗi là vec-tơ truyền vi rút *Colti* nhóm B, vi rút từ tuyến nước bọt của muỗi sẽ xâm nhập vào động vật cảm thụ. Động vật cảm thụ sẽ bị nhiễm vi rút huyết trong một thời gian và đóng vai trò là ổ chứa vi rút. Người nhiễm vi rút từ muỗi hút máu động vật cảm thụ trong giai đoạn nhiễm vi rút huyết và sẽ là vật chủ cuối cùng với vi rút, gây nên HCNC và sốt.

1.1.6.2. Phòng bệnh

Nguyên lý : Chỉ cần cắt đứt 1 trong 3 mắt xích của vòng sinh học tự nhiên của vi rút là ổ chứa vi rút, vec-tơ truyền bệnh, đối tượng cảm nhiễm.

1.2. Các phương pháp xét nghiệm chẩn đoán vi rút *Colti* nhóm B

1.2.1. Phương pháp hiển vi điện tử

1.2.1.1. Phương pháp nhuộm âm bản

Dựa vào độ phóng đại nhiều lần của kính hiển vi điện tử (KHVĐT), cho phép quan sát những cấu trúc vi sinh vật có kích thước vô cùng nhỏ bé mà dưới kính hiển vi thường không thể quan sát được (đơn vị nanomet).

1.2.1.2. Phương pháp miễn dịch hiển vi điện tử nhuộm âm bản gắn vàng

Dựa vào sự kết hợp kháng nguyên- kháng thể, khi có kháng thể đặc hiệu thì kháng nguyên sẽ gắn vào phần Fab của kháng thể, sau đó sử dụng chất đánh dấu là PrA-Au, là chất đánh dấu có khả năng gắn với phần Fc của kháng thể. Phương pháp có độ nhạy và đặc hiệu cao nếu hiệu giá kháng thể cao. Nhưng phương pháp này cần có đủ lượng kháng thể cần cho xét nghiệm và cần có trang thiết bị và sinh phẩm đắt tiền, kỹ thuật thực hiện phức tạp đòi hỏi người có kinh nghiệm.

1.2.1.3. Phương pháp lát cắt cực mỏng

Mẫu là tế bào nuôi cấy vi rút sau khi gây nhiễm bệnh phẩm được ly tâm loại bỏ nước nổi. Kết quả được quan sát bằng KHVĐT truyền qua, cho thấy vị trí của vi rút nhân lên trong tế bào. Phương pháp có độ đặc hiệu cao nhưng phải có trang thiết bị và sinh phẩm đắt tiền.

1.2.1.4. Phương pháp miễn dịch hiển vi điện tử gắn vàng trên lát cắt cực mỏng

Mẫu là tế bào sau gây nhiễm vi rút loại bỏ nước nổi, thực hiện các bước kỹ thuật cần thiết... Quan sát kết quả bằng KHVĐT thấy vi rút nhân lên trong tế bào, được đánh dấu bởi các hạt vàng 10 nm. Phương pháp có độ đặc hiệu cao, kết quả rõ ràng. Nhưng cần có trang thiết bị và sinh phẩm đắt tiền, kỹ thuật thực hiện phức tạp đòi hỏi người có kinh nghiệm.

1.2.2. Phương pháp phân lập vi rút.

Dùng tế bào muỗi *aedes albopictus* dòng C6/36 để phân lập vi rút. Đây là tiêu chuẩn vàng, để chẩn đoán chính xác nguyên nhân vi rút gây bệnh, sử dụng tế bào để phân lập vi rút có ưu điểm là không cần diện tích rộng rãi như khi sử dụng động vật thí nghiệm để phân lập. Nhưng là phương pháp rất khó đạt kết quả, do phụ thuộc vào quá nhiều yếu tố... Mặt khác, sự nhân lên của vi rút trên tế bào có thể tạo ra hiện tượng huỷ hoại tế bào, hoặc không gây ra biểu hiện nên không thể quan sát được.

1.2.3. Phương pháp huyết thanh miễn dịch học

Do tính ưu việt của kỹ thuật ELISA, là an toàn và các thao tác không phức tạp nên kỹ thuật ELISA ngày càng trở nên phổ biến.

1.2.3.1. Khái niệm về kỹ thuật ELISA

Thuật ngữ ELISA dùng để chỉ kỹ thuật miễn dịch enzyme, trong đó kháng nguyên hoặc kháng thể hoà tan được gắn vào một polimer- giá đỡ pha rắn nhưng vẫn giữ được hoạt tính miễn dịch. Để phát hiện phức hợp kháng nguyên- kháng thể có gắn enzyme, sử dụng cơ chất thích hợp. Khi phản ứng enzyme cơ chất xảy ra sẽ gây chuyển màu, qua đó đánh giá sự có mặt của kháng nguyên hoặc kháng thể cần xét nghiệm.

1.2.3.2. Các kỹ thuật ELISA có thể ứng dụng trong chẩn đoán vi rút Colti nhóm B

- Kỹ thuật ELISA- Sandwich phát hiện vi rút hoặc kháng nguyên vi rút Colti nhóm B.
- Kỹ thuật ELISA phát hiện IgM kháng vi rút Colti nhóm B.
- Kỹ thuật ELISA gián tiếp phát hiện IgG kháng vi rút Colti nhóm B.

1.2.4. Phương pháp sinh học phân tử

Thử nghiệm RT-PCR cho vi rút có ARN sợi kép với cặp môi đặc hiệu vi rút Colti nhóm B thường được sử dụng để phát hiện vi rút này: Đây là phương pháp chẩn đoán nhanh, đặc hiệu, cho kết quả chính xác, nếu được kiểm soát tốt. Có thể sử dụng để phát hiện vật liệu di truyền của vi rút trực tiếp từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng. Nhưng nếu không kiểm soát được sự lây nhiễm của các tác nhân ngoại lai, thì việc tạo ra các kết quả dương tính giả là khó tránh khỏi. Mặt khác, nếu vi rút bị đột biến thì có thể cho kết quả âm tính giả.

1.3. Các phương pháp sản xuất và tinh chế kháng thể

1.3.1. Các phương pháp sản xuất kháng thể

- Sản xuất kháng thể đa clôn
- Sản xuất kháng thể đơn clôn
- Sản xuất kháng thể tái tổ hợp

1.3.2. Các phương pháp cô đặc và tinh chế kháng thể

1.3.2.1. Phương pháp cô đặc và tinh sạch sơ bộ kháng thể (protein)

Các protein trước khi tinh chế đều lẫn các protein tạp ở dạng hỗn dịch, thể tích lớn, rất khó khăn khi tinh chế trực tiếp. Chính vì thế mà cần tinh sạch sơ bộ loại bỏ các tạp chất và cô đặc, bằng các phương pháp khác nhau như: siêu lọc, tủa, sắc ký trao đổi ion.

1.3.2.2. Các phương pháp tinh chế kháng thể có độ tinh sạch cao

- Các phương pháp sắc ký cột
- Phương pháp siêu ly tâm

1.3.2.3. Các phương pháp tinh chế IgG hiện nay

- Sắc ký ái lực cột sử dụng protein A- Sepharose hoặc protein G- Sepharose.
- Tinh chế bằng tủa amonium sulfate và sắc ký lọc gel.

1.3.3. Xác định hàm lượng protein kháng thể

- Định lượng theo phương pháp Lowry
- Định lượng bằng phương pháp quang phổ

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: các mẫu phân lập trên tế bào muỗi C6/36, có hiện tượng huỷ hoại tế bào sau gây nhiễm được chọn để nghiên cứu.

- Địa điểm nghiên cứu: Phòng nghiên cứu và sản xuất sinh phẩm, phòng thí nghiệm vi rút Arbo/viêm não, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương-Hà Nội.

- Thời gian nghiên cứu: Từ 10/2007- 10/2009.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

2.2.1. Động vật nghiên cứu

Thỏ trưởng thành: 2 con, trọng lượng trên 1,8 kg, do trung tâm chăn nuôi động vật chuẩn thức viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp.

2.2.2. Sinh phẩm

Tế bào muỗi *Aedes albopictus* dòng C6/36, kháng nguyên chuẩn vi rút Colti nhóm B chủng 05VN255 có hiệu giá vi rút là 10^7 PFU/ml, mẫu kháng nguyên vi rút VNNB có hiệu giá vi rút là 10^7 PFU/ml, mẫu kháng nguyên vi rút Rota có hiệu giá vi rút là 10^7 PFU/ml, mẫu chứng âm là nước nổi nuôi cấy tế bào không gây nhiễm vi rút, tá chất, cặp môi đặc hiệu vi rút Colti nhóm B của phân đoạn gen số 8, số 5, bộ sinh phẩm QIAamp Viral RNA mini kit, các sinh phẩm cần thiết khác cho thực hiện các kỹ thuật nghiên cứu của đề tài.

2.2.3. Các dung dịch đệm chuẩn và hoá chất

Các dung dịch đệm chuẩn được pha chế theo thường quy chuẩn thức của viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương và Viện Y học Nhiệt đới Nagasaki, Nhật Bản

2.2.4. Các dụng cụ

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. *Thiết kế nghiên cứu*: đây là nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm dựa trên các nguyên lý kỹ thuật để thực nghiệm.

2.3.2. Các kỹ thuật chế tạo kháng thể gắn bản và cộng hợp, cho bộ sinh phẩm ELISA Sandwich phát hiện vi rút Colti nhóm B

2.3.2.1. Kỹ thuật chế tạo IgG kháng vi rút Colti nhóm B

- Gây miễn dịch cho thỏ tạo kháng thể kháng vi rút Colti nhóm B
- Tinh chế sơ bộ bằng amonium sulfate bão hoà thu IgG thô
- Tinh chế IgG thô bằng sắc ký ái lực sử dụng cột protein G- Sepharose
- Kiểm tra hoạt tính miễn dịch của IgG sau tinh chế bằng kỹ thuật ELISA gián tiếp
- Kiểm tra độ tinh sạch của IgG bằng điện di trên gel SDS - PAGE

2.3.2.2. Chế tạo cộng hợp (IgG thỏ kháng vi rút gắn enzyme HRPO)

Theo phương pháp của Wilson và Nakan có cải tiến

2.3.2.3. Gắn bản IgG kháng vi rút cho kỹ thuật ELISA – Sandwich.

2.3.2.4. Kỹ thuật miễn dịch enzyme gián tiếp kiểm tra hiệu giá IgG kháng vi rút Colti nhóm B (Indirect- ELISA)

2.3.2.5. Kỹ thuật ELISA Sandwich

2.3.3. Phương pháp chuẩn độ, xác định hiệu giá, xác định độ đặc hiệu, xác định độ nhạy của sinh phẩm chế tạo

2.3.3.1. Chuẩn độ hiệu giá IgG kháng vi rút Colti nhóm B và kháng thể gắn enzyme HRPO bằng kỹ thuật ELISA-Sandwich.

2.3.3.2. Xác định hiệu giá cộng hợp (IgG gắn enzyme HRPO).

2.3.3.3. Xác định độ đặc hiệu của sinh phẩm sản xuất.

2.3.3.4. Xác định độ nhạy (ngưỡng phát hiện vi rút) của sinh phẩm.

2.3.4. So sánh kết quả phát hiện vi rút bằng kỹ thuật ELISA và PCR

2.3.4.1. Kỹ thuật ELISA Sandwich

Sử dụng sinh phẩm chế tạo được cho kỹ thuật ELISA Sandwich

2.3.4.2. Kỹ thuật RT-PCR

2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng Test Anova, toàn bộ giá trị thực (X) đều nằm trong khoảng $\bar{X} \pm 2SD$ và giá trị CV giao động trong khoảng 0,05-9,8.

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả chế tạo IgG thỏ kháng vi rút *Colti* nhóm B và cộng hợp

3.1.1. Kết quả chế tạo IgG thỏ kháng vi rút

3.1.1.1. Kết quả gây miễn dịch cho thỏ

Bảng 3.1. Hiệu giá kháng thể thỏ trước và sau gây miễn dịch với kháng nguyên vi rút Colti nhóm B chủng 05VN255

Thời gian lấy máu thỏ	Hiệu giá ELISA- IgG
Trước khi gây miễn dịch (N1)	Âm tính
Sau khi gây miễn dịch mũi thứ hai (N14)	100 đơn vị ELISA
Sau khi gây miễn dịch mũi thứ hai tuần (N56)	10000 đơn vị ELISA

Nhân xét: Thỏ có đáp ứng miễn dịch tốt, hiệu giá tăng từ 100 đơn vị ELISA lên 10000 đơn vị, huyết thanh đạt tiêu chuẩn chế tạo kháng thể.

3.1.1.2. Kết quả tinh chế IgG thỏ kháng vi rút *Colti* nhóm B

Bảng 3.2. Hiệu giá IgG kháng vi rút Colti nhóm B trước và sau khi sơ chế

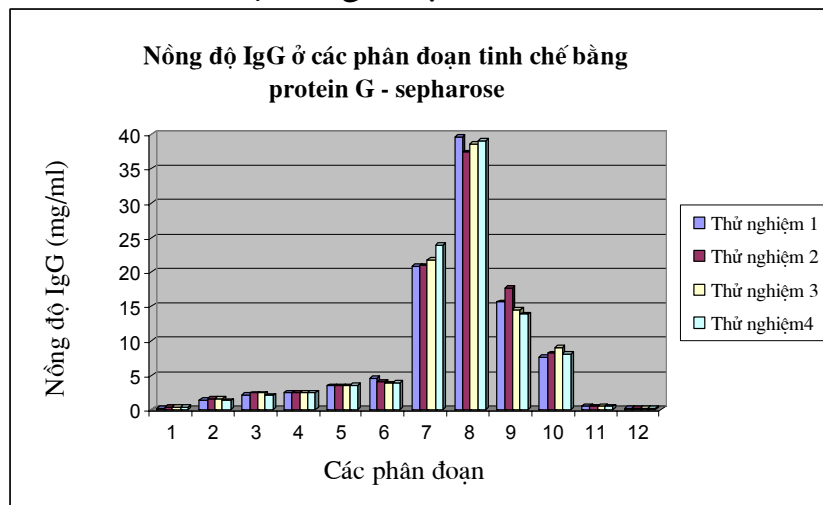
	Protein toàn phần (mg)		Hiệu giá kháng (EU)	
	<i>Trong 1 ml</i>	<i>Tổng số</i>	<i>Trong 1 ml</i>	<i>Tổng số</i>
Huyết thanh Thỏ	64,3	2572	10000	400000
Sau sơ chế	44,7	1788	10000	400000
Hiệu suất sơ chế	Loại bỏ 30,5%		100%	

Nhân xét: Hiệu giá kháng thể đạt 100% nhưng đã loại bỏ được một lượng protein tạp khá cao trong huyết thanh thỏ (30,5%), tổng thể tích IgG sau sơ chế thu được là 40ml.

Bảng 3.3. Kết quả tinh chế IgG bằng protein G qua cột Hi Trap

Phân đoạn	OD 280	OD 260	Nồng độ IgG (mg/ml)	Thể tích (ml)
1	0,337 ± 0,01	0,174 ± 0,02	0,132 ± 0,2	1
2	0,637 ± 0,02	0,123 ± 0,13	1,442 ± 0,31	1
3	0,998 ± 0,25	0,243 ± 0,01	2,168 ± 0,28	1
4	1,101 ± 0,14	0,987 ± 0,24	2,489 ± 0,09	1
5	1,567 ± 0,20	1,103 ± 0,21	3,456 ± 0,24	1
6	2,860 ± 0,17	1,741 ± 0,20	4,560 ± 0,19	1
7	9,960 ± 0,21	6,780 ± 0,19	20,921 ± 0,22	1
8	17,56 ± 0,23	12,300 ± 0,26	39,668 ± 0,16	1
9	8,461 ± 0,18	5,990 ± 0,21	15,644 ± 0,27	1
10	4,450 ± 0,19	2,345 ± 0,24	7,563 ± 0,43	1
11	0,557 ± 0,04	0,360 ± 0,09	0,482 ± 0,26	1
12	0,133 ± 0,12	0,096 ± 0,23	0,171 ± 0,41	1

Nhận xét: Hàm lượng trung IgG đạt đỉnh ở các phân đoạn 7,8,9,10 và được lặp lại qua 4 lần tinh chế. Toàn bộ các giá trị $X \in X \pm 2SD$; $CV < 10$.



Biểu đồ 3.1 : Tinh chế IgG thô bằng bộ sinh phẩm Mab Trap

Nhận xét: Thu hoạch IgG từ các phân đoạn 7, 8, 9, 10, tổng thể tích IgG tinh khiết tách chiết từ 40ml IgG thô, đã sơ chế ở giai đoạn 1 đạt được là 16 ml. IgG thô kháng vi rút *Colti* nhóm B chủng 05VN255 sau tinh chế có hàm lượng protein đạt 18,70 mg/ml.

Bảng 3.4. Hiệu suất tinh chế và tinh sạch IgG qua hai giai đoạn sơ chế và tinh chế

	Protein (mg)			Hiệu giá (EU)		Hiệu suất tinh chế
	Trong 1ml	Tổng số	Đã loại bỏ	Trong 1ml	Tổng số	
Huyết thanh thô	64,3	2572	-	10000	400000	-
Sơ chế IgG (giai đoạn 1)	34,47	1788	30,5%	10000	400000	100%
Tinh chế IgG (giai đoạn 2)	18,70	299,2	88,4%	20000	320000	80%

Nhận xét: Giai đoạn 1 hiệu suất tinh chế đạt 100%, giai đoạn 2 hiệu suất tinh chế đạt 80%

3.1.1.3. Kết quả kiểm tra chất lượng IgG thử kháng vi rút Colti nhóm B

Bảng 3.5. Xác định hoạt tính của IgG thử sau tinh chế

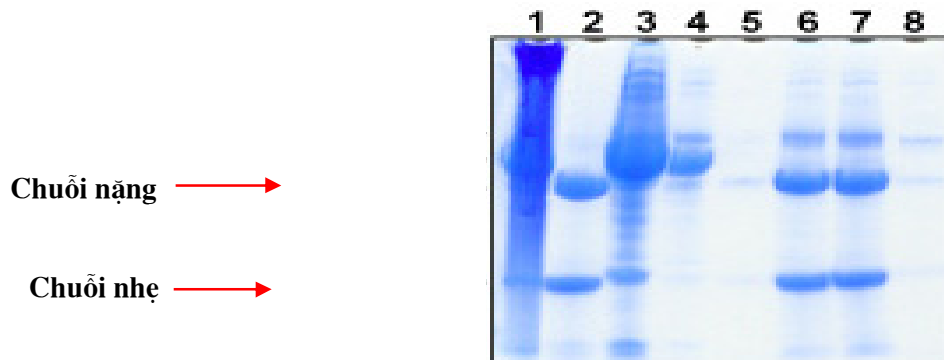
Loại mẫu		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Blank	A	0,021	0,023	0,022	0,023	0,023	0,028	0,025	0,024	0,020	0,029	0,026	0,028
	B	0,030	0,024	0,021	0,023	0,029	0,022	0,024	0,026	0,016	0,029	0,028	0,029
Chứng âm	C	0,023	0,021	0,022	0,021	0,023	0,025	0,028	0,024	0,015	0,023	0,024	0,030
	D	0,021	0,030	0,029	0,023	0,025	0,022	0,026	0,029	0,017	0,021	0,029	0,029
Chứng dương	E	1,813	1,773	1,807	1,797	1,738	1,776	1,750	1,763	1,799	1,766	1,770	1,819
	F	1,736	1,756	1,829	1,769	1,753	1,789	1,785	1,745	1,812	1,809	1,828	1,810

Hàng A, B: Blank (PBS)

Hàng C, D: Chứng âm (nước nổi nuôi cấy tế bào không gây nhiễm vi rút)
Hàng E, F: Chứng dương (kháng nguyên vi rút *Colti* nhóm B)

Nhận xét: Hoạt tính của IgG sau tinh chế với hiệu giá kháng thể tham gia phản ứng pha loãng 1/20000. ở các giếng chứng âm và blank, giá trị OD lần lượt là $0,0233 \pm 0,004$ và $0,0215 \pm 0,0037$, các giếng chứng dương giá trị OD đạt $1,781 \pm 0,026$.

3.1.1.4. Kết quả xác định độ tinh sạch của IgG sau tinh chế



Ảnh 3.1. Kết quả xác định độ tinh sạch của IgG thô đã tinh chế

Giếng số 1: Thang protein chuẩn có trọng lượng phân tử 14- 98 KD

Giếng 3: IgG sau sơ chế

Giếng 2, 4, 5, 6, 7, 8: IgG ở phân đoạn 8, 5, 6, 7, 9, 10.

Nhận xét: IgG sau tinh chế tương đối tinh sạch, vì ngoài 2 vạch của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của IgG thấy có rất ít vạch khác của các protein tạp.

3.1.2. Kết quả chế tạo IgG thô kháng vi rút *Colti* nhóm B chủng 05VN255 gắn enzyme HRPO.

Sử dụng 1 ml IgG thô kháng vi rút *Colti* nhóm B chủng 05VN255 đã tinh chế có hàm lượng protein là 10 mg/ml, để tạo cộng hợp đặc hiệu kháng vi rút *Colti* nhóm B chủng 05VN255. Quy trình tạo cộng hợp được thực hiện trong 4 ngày liên tục, kết quả đã tạo được 2 ml cộng hợp để sử dụng cho kỹ thuật ELISA Sandwich, phát hiện vi rút hoặc kháng nguyên vi rút *Colti* nhóm B.

3.1.3. Kết quả xác định hiệu giá của IgG thô kháng vi rút *Colti* nhóm B và cộng hợp gắn enzyme HRPO cho bộ sinh phẩm ELISA Sandwich

3.1.3.1. Chuẩn độ hiệu giá IgG thô kháng vi rút *Colti* nhóm B và cộng hợp gắn enzyme HRPO cho kỹ thuật ELISA-Sandwich áp dụng phương pháp chuẩn độ bàn cờ.

Nhận xét: (dưới bảng 3.6) Nồng độ cộng hợp 1/2000 là điểm giữa của đồng biến thiên, còn hiệu giá kháng thể gắn bản có thể được lựa chọn với nhiều độ pha loãng khác nhau từ 1/200 đến 1/25600.

Bảng 3.6. Kết quả chuẩn độ IgG thử kháng vi rút Colti nhóm B và cộng hợp cho bộ sinh phẩm ELISA Sandwich
Độ pha loãng cộng hợp

HR PO IgG	Độ pha loãng cộng hợp											
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/1	1/3	1/1	1/2	1/4	1/8	1/1	1/3
	00	00	00	00	600	200	00	00	00	00	600	200
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/2 00	>3, 00 0	2,2 97	1,9 57	0,9 67	0,7 09	0,4 41	0,1 44	0,0 74	0,0 44	0,0 58	0,0 29	0,0 10
1/4 00	>3, 00 0	1,5 05	0,7 54	0,5 20	0,4 18	0,2 19	0,1 34	0,0 64	0,0 34	0,0 20	0,0 34	0,0 60
1/8 00	>3, 00 0	1,2 47	0,3 24	0,2 69	0,2 20	0,1 18	0,1 56	0,0 56	0,0 56	0,0 29	0,0 21	0,0 07
1/1 600	>3, 00 0	1,1 27	0,1 73	0,1 22	0,1 19	0,0 56	0,1 38	0,0 58	0,0 38	0,0 22	0,0 19	0,0 09
1/3 200	>3, 00 0	0,9 19	0,1 48	0,0 85	0,0 78	0,0 37	0,1 56	0,0 56	0,0 56	0,0 25	0,0 21	0,0 06
1/6 400	2,7 45	0,8 52	0,1 17	0,0 56	0,0 47	0,0 36	0,1 25	0,0 55	0,0 52	0,0 26	0,0 17	0,0 07
1/1 280	1,5 77	0,8 50	0,1 51	0,0 45	0,0 26	0,0 26	0,1 20	0,0 59	0,0 50	0,0 25	0,0 12	0,0 10
1/2 560	1,9 55	0,7 82	0,1 00	0,0 25	0,0 16	0,0 15	0,1 14	0,0 64	0,0 64	0,0 25	0,0 19	0,0 08
Chứng dương (chủng vi rút 05VN255)						Chứng âm (nước nổi tế bào không gây nhiễm vi rút)						

3.1.3.2. Xác định hiệu giá IgG gắn bản để tạo bộ sinh phẩm

Bảng 3.7. Kết quả xác định hiệu giá IgG gắn bản cho bộ sinh phẩm

Nồng độ IgG gắn bản	Chứng dương			Chún g âm
	10 ⁷ PFU/ml	10 ⁵ PFU/ml	10 ³ FU/ml	
1/200	>3,000	1,205	0,867	0,073
1/400	2,556	0,921	0,712	0,045
1/800	1,497	0,667	0,501	0,034
1/1600	0,967	0,479	0,345	0,034
1/3200	0,709	0,301	0,198	0,034
1/6400	0,444	0,234	0,123	0,031
1/12800	0,298	0,157	0,096	0,030
1/25600	0,180	0,101	0,070	0,029

Nhận xét: Cộng hợp ở độ pha loãng 1/2000, hiệu giá của IgG kháng vi rút *Colti* nhóm B cần được sử dụng ở độ pha loãng 1/1600 để gắn bản cho bộ sinh phẩm ELISA Sandwich.

3.1.3.3. Xác định hiệu giá cộng hợp gắn enzyme để tạo bộ sinh phẩm

Bảng 3.8. Xác định hiệu giá cộng hợp gắn enzyme HRPO cho bộ sinh phẩm

Nồng độ cộng hợp	Chứng dương		Chún g âm
	Chứng dương mạnh (10 ⁷ PFU/ml)	Chứng d-ương yếu (10 ³ PFU/ml)	
1/1000	>3,000	0,679	0,058
1/2000	2,556	0,335	0,075
1/4000	1,497	0,238	0,058
1/8000	0,967	0,195	0,047
1/16000	0,709	0,120	0,034
1/32000	0,444	0,080	0,029
1/64000	0,298	0,075	0,021
1/128000	0,180	0,040	0,012

Nhận xét: Nồng độ cộng hợp có khả năng phát hiện vi rút có nồng độ là 10^3 FFU/ml. Như vậy nồng độ cộng hợp IgG thổ kháng vi rút *Colti* nhóm B - PO lựa chọn sẽ là 1/2000.

3.1.4. Thiết kế bộ sinh phẩm ELISA Sandwich dùng để phát hiện vi rút hoặc kháng nguyên vi rút *Colti* nhóm B

Bộ sinh phẩm được thiết kế bao gồm những thành phần sau:

1. Thanh nhựa đã phủ IgG thổ kháng vi rút *Colti* nhóm B.
2. Các lọ sinh phẩm và dung dịch cần thiết cho kỹ thuật.
3. Bản hướng dẫn cách pha chế, chuẩn bị các dung dịch, sinh phẩm và các bước thực hiện kỹ thuật cũng như nhận định kết quả.

Thành phần bộ sinh phẩm chẩn đoán vi rút Colti nhóm B

- 1) Thanh nhựa đáy bằng 2x8 giếng gắn IgG kháng vi rút *Colti* nhóm B chủng 05VN255. Bảo quản ở -20°C .
- 2) Chứng dương: Kháng nguyên vi rút *Colti* nhóm B chủng 05VN255, có hiệu giá vi rút là 10^7 PFU /ml: 200 μl / lọ đã bất hoạt bằng formalin 0,006 %. Bảo quản ở -20°C .
- 3) Chứng âm: Nước nổi nuôi cấy tế bào *Aedes albopictus* dòng C6/36, không gây nhiễm vi rút. Bảo quản -20°C .
- 4) Cộng hợp: IgG thổ kháng vi rút *Colti* nhóm B gắn enzyme HRPO đặc 50 lần, 50 μl /lọ là Bảo quản ở -20°C .
- 5) Cơ chất hiện màu: 2 mg OPD (Ortho- Phenylendiamin) tinh thể, đóng lọ màu nâu để tránh ánh sáng. Bảo quản 4°C .
- 6) Dung dịch đệm pha cơ chất: 4 ml dung dịch đệm phosphate citrate có chứa 0,03% H_2O_2 pH 5.0. Bảo quản 4°C .
- 7) Dung dịch pha loãng: 10 ml PBS-T có 0,1% Tween và đỏ phenol. Bảo quản 4°C
- 8) Dung dịch rửa PBS-T (x10): lọ 20 ml khi dùng pha với nước cất vừa đủ để có 200 ml dung dịch PBS-T dùng cho kỹ thuật. Bảo quản 4°C
- 9) Dung dịch dùng phản ứng: 2ml $\text{H}_2\text{SO}_4.1\text{N}$. Bảo quản 4°C
- 10) Bản hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm.

3.1.5. Kiểm tra chất lượng bộ sinh phẩm

Bảng 3.9. Kiểm tra dung dịch hoá chất sử dụng để tạo bộ sinh phẩm

Loại thành phẩm	Dạng	Tính chất lý hoá	Kết quả kiểm tra
Dung dịch pha loãng	Dung dịch	Màu đỏ nhạt, pH 7.2	Đạt yêu cầu
Dung dịch	Dung	Không màu,	Đạt yêu

PBS-T	dịch	pH 7.2	câu
Dung dịch pha cơ chất	Dung dịch	Không màu, pH 5.0	Đạt yêu cầu
Cơ chất OPD	Bột	Màu nâu nhạt	Đạt yêu cầu

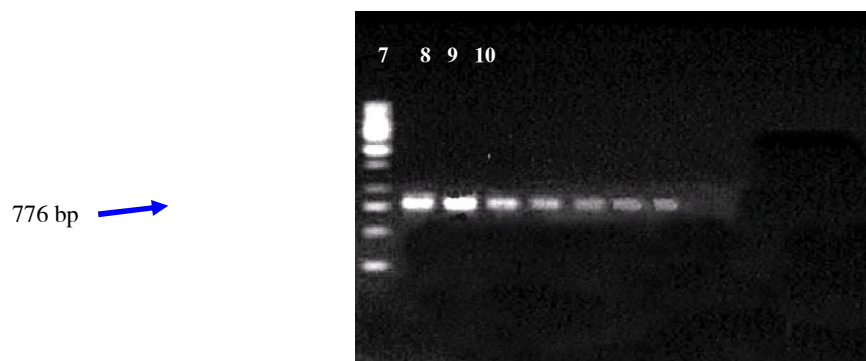
3.1.5.1. Kết quả xác định độ nhạy của bộ sinh phẩm cho kỹ thuật ELISA-Sandwich.

Bảng 3.10. Kết quả xác định độ nhạy của bộ sinh phẩm cho kỹ thuật ELISA- Sandwich

	Nồng độ kháng nguyên vi rút <i>Colti</i> nhóm B (PFU/ml)							Chứng âm	Blank
	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1		
OD trung bình	2,569	0,779	0,502	0,351	0,345	0,158	0,145	0,059	0,053
SD	0,1	0,04	0,03	0,025	0,017	0,09	0,005	0,002	0,003
CV	3,89	5,13	5,97	7,12	4,9	5,6	3,4	3,35	5,66

Mẫu được xác định dương tính có nồng độ vi rút thấp nhất (10^3 PFU) có mật độ quang học là $0,345 \pm 0,017$, mật độ quang học của mẫu dương tính này phù hợp với yêu cầu của kỹ thuật ELISA Sandwich phát hiện kháng nguyên (Tiêu chuẩn kỹ thuật yêu cầu OD mẫu dương tính phải $> 0,300$). Thử nghiệm được thực hiện 3 lần. Tất cả các giá trị $X \in X \pm 2SD$, CV từ 3,4 – 7,12.

3.1.5.2. Ngưỡng phát hiện kháng nguyên vi rút Colti nhóm B của kỹ thuật RT-PCR



Ảnh 3.2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR xác định độ nhạy của kỹ thuật RT – PCR phát hiện ARN của vi rút Colti nhóm B chủng 05VN255.

Nhận xét: Kỹ thuật RT-PCR có khả năng phát hiện vi rút Colti nhóm B có hiệu giá $\geq 10^2$ PFU/ml, đối với mẫu có hiệu giá vi rút thấp $\leq 10^2$ PFU/ml, kỹ thuật RT-PCR không phát hiện được vi rút.

Bảng 3.11. So sánh ngưỡng phát hiện vi rút Colti nhóm B bằng bộ sinh phẩm ELISA Sandwich với kỹ thuật RT-PCR .

Hiệu giá vi rút (PFU/ml)	ELISA Sandwich	RT - PCR
10^7	Dương tính	Dương tính
10^6	Dương tính	Dương tính
10^5	Dương tính	Dương tính
10^4	Dương tính	Dương tính
10^3	Dương tính	Dương tính
10^2	Âm tính	Dương tính
10^1	Âm tính	Âm tính

Nhận xét: Kỹ thuật RT-PCR với cặp môi sử dụng trong nghiên cứu này có độ nhạy cao hơn kỹ thuật ELISA Sandwich.

Bảng 3.14. Nghiên cứu sự ổn định của bộ sinh phẩm ELISA Sandwich theo thời gian bảo quản qua kết quả kiểm tra loạt 02

OD	Thời gian kiểm định sau khi sản xuất (tháng)						\bar{x}
	0	3	6	9	12	15	
Chứng âm	0,051	0,050	0,054	0,055	0,053	0,051	0,052±0,002
Blank	0,055	0,059	0,065	0,054	0,065	0,065	0,061±0,005
Chứng dương	0,952	0,954	0,935	0,947	0,943	0,951	0,947±0,007
Kết luận	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	

Bảng 3.15. Nghiên cứu sự ổn định của bộ sinh phẩm ELISA Sandwich theo thời gian bảo quản qua kết quả kiểm tra loạt 03

OD	Thời gian kiểm định sau khi sản xuất (tháng)						\bar{x}
	0	3	6	9	12	15	
Chứng âm	0,054	0,053	0,054	0,057	0,057	0,058	0,055±0,002
Blank	0,056	0,055	0,055	0,056	0,066	0,067	0,059±0,005
Chứng dương	0,958	0,964	0,955	0,957	0,953	0,950	0,956±0,005
Kết luận	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	

Nhận xét: 03 loạt bộ sinh phẩm rất ổn định về giá trị OD của các mẫu chứng dương, chứng âm và blank với tất cả các giá trị $X \in X \pm 2SD$, $CV < 10$.

3.2.2. Ứng dụng bộ sinh phẩm ELISA Sandwich để phát hiện vi rút Colti nhóm B.

3.2.2.1. Kết quả phát hiện vi rút từ các mẫu phân lập

Bảng 3.16. Kết quả sử dụng bộ sinh phẩm chế tạo phát hiện vi rút và kháng nguyên vi rút Colti nhóm B bằng kỹ thuật ELISA Sandwich

Kết quả thử nghiệm	Số lượng	Tỷ lệ %
Dương tính	29	40,27
Âm tính	43	59,73
Cộng	72	100

Nhân xét: Xét nghiệm 72 mẫu nước nổi nuôi cấy tế bào phân lập vi rút từ muối kết quả xác định có 29 mẫu dương tính, 43 mẫu âm tính. Tỷ lệ phát hiện dương tính bằng bộ sinh phẩm ELISA Sandwich là 40,27%.

Bảng 3.17. Kết quả xét nghiệm các mẫu bệnh phẩm bằng phương pháp RT-PCR với cặp môi đặc hiệu vùng gen số 8 của vi rút Colti nhóm B

Kết quả thử nghiệm	Số lượng	Tỷ lệ %
Dương tính	27	37,50
Âm tính	45	62,50
Cộng	72	100

Nhân xét: Kỹ thuật RT-PCR với cặp môi đặc hiệu vi rút *Colti* nhóm B xét nghiệm 72 mẫu nước nổi nuôi cấy tế bào phân lập vi rút *Colti* nhóm B từ các mẫu muối. Kết quả có 27 mẫu vi rút phân lập được xác định dương tính, 45 mẫu được xác định âm tính, tỷ lệ dương tính được xác định bằng kỹ thuật RT-PCR là 37,50%.

3.2.2.2. *Đánh giá sự phù hợp về kết quả chẩn đoán vi rút Colti nhóm B bằng bộ sinh phẩm mới chế tạo so sánh với kỹ thuật RT-PCR*

Bảng 3.18. So sánh kết quả của ELISA Sandwich và RT – PCR

ELISA \ PCR	Dương tính	Âm tính	Cộng
Dương tính	27	0	27 (37,50%)
Âm tính	2	43	45 (59,73%)
Cộng	29 (40,27%)	43 (62,50%)	72 (100%)

Nhân xét: Có 70 mẫu có sự phù hợp kết quả giữa 2 kỹ thuật khác nhau, với độ phù hợp Kappa có $k = 0,94$ (độ phù hợp rất cao). Sự khác biệt giữa hai kỹ thuật không có ý nghĩa thống kê (với $p > 0,05$).

3.2.3.3. *Kết quả ứng dụng bộ sinh phẩm ELISA Sandwich chế tạo để xác định sự lưu hành của vi rút Colti nhóm B ở một số địa phương.*

Khu vực	Năm	Địa phương	Số mẫu xét nghiệm	Số (+)	Số (-)
---------	-----	------------	-------------------	--------	--------

Miền Bắc	2002	Hà Tây	02	02	0
	2006 - 2008	Bắc Giang	21	07	14
	2007	Hà Nam	01	0	01
Miền Trung	2002	Quảng Bình	01	01	0
Tây Nguyên	2004 - 2006	Gia Lai	13	09	04
	2006 - 2007	Đắc Nông	04	02	02
	2006 - 2007	Kon Tum	10	06	04
	2007	Đắc Lắc	04	0	04
	2007	Bản Mây	01	0	01
	Miền Nam	2005	Cần Thơ	12	02
	2005	Long An	02	0	02
TỔNG SỐ			72	29	43

Nhận xét: Những mẫu phân lập sử dụng chủ yếu cho mục đích kiểm tra bộ sinh phẩm, nên nó không có tính đại diện theo vùng địa lý, nhưng kết quả nghiên cứu bước đầu này sẽ định hướng cho những nghiên cứu tiếp theo về sự lưu hành của vi rút cũng như các loài muỗi là véc-tơ của vi rút Colti nhóm B ở Việt Nam.

Chương 4 BÀN LUẬN

4.1. VIỆC CHẾ TẠO IGG KHÁNG VI RÚT *COLTI* NHÓM B CHỦNG 05VN255 VÀ CỘNG HỢP

4.1.1. Chế tạo IgG thỏ đặc hiệu kháng vi rút

4.1.1.1. Gây miễn dịch cho thỏ

Khi gây miễn dịch cho động vật tạo kháng thể thì các vấn đề cần quan tâm để đạt được hiệu quả đáp ứng miễn dịch cao, kháng thể được tạo ra có độ nhạy và độ đặc hiệu cao đó là

Kháng nguyên: loại kháng nguyên bao gồm toàn bộ vi sinh vật, kháng nguyên tiểu đơn vị, ở dạng epitop, dạng kháng nguyên, độ tinh sạch. Liều gây miễn dịch, số lần gây miễn dịch, tá chất và đường gây miễn dịch. Lựa chọn loài động vật phù hợp và không gây miễn dịch với một loại kháng nguyên khác nhau.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kháng nguyên vi rút *Colti* nhóm B chủng 05VN255 rất tinh khiết và bao gồm tất cả các thành phần kháng nguyên của hạt vi rút hoàn chỉnh. Do đó kháng thể được tạo ra sẽ có độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

Hàm lượng kháng nguyên để gây miễn dịch cho thỏ cũng như số lần gây miễn dịch là rất quan trọng

Để kích thích khả năng sinh miễn dịch của động vật, thường sử dụng tá chất Freund hoàn chỉnh và không hoàn chỉnh (complet và incomplet) để trộn với kháng nguyên tạo thành dạng nhũ tương (emulsion) tiêm cho động vật theo tỷ lệ 1:1, trong nghiên cứu này, kháng nguyên vi rút *Colti* nhóm B tinh chế được kết hợp với hai loại tá chất là Freund và Titermax classic. Titermax classic là loại tá chất đặc biệt có thành phần CRL 89- 41 là một chất làm tăng đáp ứng miễn dịch mạnh hơn tá chất Freund, do đó giúp thỏ có đáp ứng miễn dịch để sinh kháng thể tốt hơn. Kết quả quá trình gây miễn dịch cho thấy trước khi gây miễn dịch, thỏ không có kháng thể đặc hiệu kháng vi rút *Colti* nhóm B, sau khi gây miễn dịch hiệu giá kháng thể đã tăng lên tới 10000 lần. Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi phù hợp với những nghiên cứu trước đây của Phan Thị Ngà và Nguyễn Hạnh Phúc năm 2006.

4.1.1.2. Tinh chế IgG thỏ kháng vi rút *Colti* nhóm B chủng 05VN255 và gắn bản kháng thể IgG

Có rất nhiều phương pháp tinh chế IgG với mức độ tinh khiết khác nhau như tinh chế bằng phương pháp tủa với amonium sulphat, tinh chế bằng sắc ký ái lực miễn dịch, sử dụng cột kháng nguyên đặc hiệu hoặc tinh chế bằng

protein A, protein G gắn sepharose... Tuỳ theo yêu cầu về độ tinh khiết của IgG mà có thể lựa chọn một trong những phương pháp phù hợp.

Trước đây các phòng thí nghiệm trên thế giới hay dùng phương pháp cổ điển để tinh chế IgG trong huyết thanh đó là phương pháp tủa IgG bằng amonium sulfate bão hoà trong đệm photphate pH=7,4 và sau đó chạy qua cột trao đổi ion, IgG tinh chế từ phương pháp này có độ tinh sạch không cao. Gần đây, có nhiều bộ kit tách chiết IgG được thương mại hoá trên thị trường với việc sử dụng protein A hoặc protein G làm cột Hi Trap để tóm bắt IgG từ huyết thanh và thu hồi IgG tinh khiết. Trong đề tài nghiên cứu này, tinh chế IgG đặc hiệu kháng vi rút *Colti* nhóm B chủng 05VN255 từ huyết thanh thô toàn phần, được thực hiện qua hai giai đoạn: giai đoạn 1 sử dụng muối amonium sulfate bão hoà để loại bỏ bớt albumin từ huyết thanh và IgG thu được ở dạng thô; giai đoạn 2 sử dụng protein G để tóm bắt IgG thô, sau đó tách IgG thô ra khỏi protein G bằng dung dịch tách chiết để thu IgG thô kháng vi rút tinh khiết.

Qua thực hành chúng tôi thấy việc phối hợp hai phương pháp tủa IgG 2 lần bằng amonium sulfate bão hoà và tiếp đó là sắc ký cột ái lực, sử dụng phức gắn protein G- sepharose để tinh chế IgG từ huyết thanh thô là phương pháp ưu việt.

4.1.2. Việc chế tạo IgG kháng vi rút *Colti* nhóm B gắn enzyme HRPO

4.1.2.1. Sự lựa chọn enzyme HRPO để tạo cộng hợp

HRPO thường được sử dụng vì những lý do sau: Các enzyme nói chung đều rất đắt, nhưng enzyme HRPO rẻ hơn cả, do nguồn vật liệu để sản xuất HRPO rất thông dụng; Độ nhạy và đặc hiệu của kỹ thuật ELISA được đáp ứng do khi dùng HRPO không xuất hiện màu do enzyme nội sinh, nên không gây nhiễu phản ứng miễn dịch, điều này thể hiện ở các giếng chứng âm và giếng blank, nên của kỹ thuật ELISA có mật độ quang thấp OD < 0,100.

Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng enzyme HRPO và cơ chất OPD cho kỹ thuật ELISA.

4.1.2.2. Việc dùng natriperiodat ($NaIO_4$) hoạt hoá enzyme HRPO tạo cộng hợp kháng thể

Có nhiều loại hoá chất sử dụng để hoạt hoá enzyme HRPO, như phương pháp dùng glutaraldehyd, nhưng hoạt hoá bằng loại hoá chất này chỉ có khoảng 10% enzyme được hoạt hoá. Còn nếu sử dụng hoá chất là natriperiodat thì có ít nhất 80 - 90% enzyme được hoạt hoá. Do vậy, natriperiodat đã được sử dụng để hoạt hoá enzyme HRPO trong nghiên cứu này. Phương pháp oxy hoá enzyme bằng natriperiodat, để xúc tác phản ứng giữa enzyme và kháng thể được thực hiện qua cầu nối giữa nhóm $-NH_2$ của IgG với nhóm $-CHO$ của enzyme tạo ra 1 base schiff. Nhóm $-CHO$ của enzyme tạo thành do sự

oxy hoá chức alcohol của phân hydrat cacbon của enzyme với một chất oxy hoá.

4.1.3. Chuẩn độ các thành phần IgG và IgG – HRPO tạo bộ sinh phẩm ELISA Sandwich và đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ sinh phẩm

Để sản xuất bộ sinh phẩm, việc chuẩn độ, lựa chọn nồng độ IgG gắn bản và cộng hợp IgG – PO là rất quan trọng để đảm bảo độ nhạy và độ đặc hiệu cũng như sự ổn định của bộ sinh phẩm. Dựa trên kết quả chuẩn độ với những mẫu chứng dương có hiệu giá vi rút khác nhau bao gồm chứng dương tính mạnh, dương tính trung bình, dương tính yếu (ngưỡng phát hiện) để lựa chọn hiệu giá kháng thể gắn bản phù hợp đảm bảo được độ nhạy (giới hạn phát hiện của bộ sinh phẩm đạt 10^3 PFU/ml). Dựa trên kết quả chuẩn độ, từ sinh phẩm gốc, nồng độ IgG gắn bản tối ưu được lựa chọn là 1/1600 (tương đương 0,5 µg/ml) và nồng độ cộng hợp tối ưu đạt được ở độ pha loãng 1/2000.

Độ nhạy và độ đặc hiệu: Để đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ sinh phẩm trong xét nghiệm, thường sử dụng một trong hai cách đó là: (1) Dùng panel mẫu chuẩn (còn gọi là dàn mẫu chuẩn) để kiểm tra hoặc (2) So sánh với một bộ sinh phẩm chuẩn khác.

4.2. ĐỘ ỔN ĐỊNH VÀ HIỆU QUẢ CHẨN ĐOÁN VI RÚT COLTI NHÓM B CỦA SINH PHẨM CHẾ TẠO SO SÁNH VỚI PHƯƠNG PHÁP KHÁC

4.2.1. Sự ổn định của bộ sinh phẩm ELISA Sandwich

Theo dõi độ ổn định của bộ sinh phẩm ELISA Sandwich được chế tạo trong nghiên cứu này được tuân thủ theo quy định chung là 2 đến 3 tháng một lần, thời điểm cuối cùng kiểm tra loạt sinh phẩm được thực hiện sau thời gian ấn định hạn sử dụng sinh phẩm ít nhất là trên 1 tháng. Do vậy, trong nghiên cứu này các thời điểm theo dõi định kỳ sự ổn định của bộ sinh phẩm sau chế tạo là: tháng 0, 3, 6, 9, 12 và 15. Kết quả nghiên cứu đã xác định, trong điều kiện bảo quản bộ sinh phẩm theo yêu cầu, bộ sinh phẩm ELISA Sandwich có sự ổn định về kết quả xét nghiệm trong các thời điểm khác nhau cho đến thời điểm tháng thứ 15 thời gian sau chế tạo sinh phẩm. Do vậy, chúng tôi đề xuất hạn sử dụng bộ sinh phẩm chế tạo trong nghiên cứu này là 12 tháng, điều kiện bảo quản theo hướng dẫn sử dụng sinh phẩm (các sinh phẩm gồm có thanh nhựa gắn kháng thể, cộng hợp, các mẫu chứng cần bảo quản ở -20°C , dung dịch, hoá chất của bộ sinh phẩm bảo quản ở 4°C).

4.2.2. Phát hiện vi rút *Colti* nhóm B bằng bộ sinh phẩm ELISA Sandwich

Thực hiện song song kỹ thuật ELISA Sandwich, sử dụng bộ sinh phẩm chế tạo và kỹ thuật RT – PCR với cặp mồi đặc hiệu cho phân đoạn gen 8 để xác định vi rút *Colti* nhóm B trong 72 mẫu nước nổi tế bào có hiện tượng bệnh lý. Có 2 mẫu dương tính khi áp dụng kỹ thuật ELISA Sandwich, nhưng lại âm tính khi áp dụng kỹ thuật RT-PCR. Khi sử dụng hai cặp mồi khác, đặc hiệu với vi rút *Colti* nhóm B ở vùng gen số 5 để kiểm tra với hai mẫu vi rút này. Kết quả xác định hai mẫu này dương tính. Chính vì vậy, nghiên cứu phát triển kỹ thuật PCR đa mồi đã được nhiều nhà khoa học quan tâm, để tránh hiện tượng âm tính giả khi sử dụng kỹ thuật này trong chẩn đoán. Điều đó cho thấy, kỹ thuật PCR sẽ không thể thay thế được các kỹ thuật miễn dịch ELISA và kỹ thuật phân lập trong chẩn đoán vi sinh vật.

So sánh kết quả xác định vi rút *Colti* nhóm B bằng kỹ thuật RT-PCR và ELISA Sandwich, cho thấy sự phù hợp kết quả xét nghiệm của hai kỹ thuật này rất cao trên 70/72 mẫu có kết quả xét nghiệm giống nhau (cùng âm tính hoặc cùng dương tính). Như vậy bộ sinh phẩm của chúng tôi sản xuất không có sự khác biệt về độ nhạy và đặc hiệu giữa hai phương pháp RT-PCR và ELISA-Sandwich vì tính theo độ phù hợp Kappa có $k = 0,94$, đây là độ phù hợp cao về kết quả chẩn đoán của sinh phẩm.

4.2.3. Ưu điểm của việc sử dụng bộ sinh phẩm ELISA trong xét nghiệm.

Việc chế tạo thành công bộ sinh phẩm phát hiện vi rút *Colti* nhóm B bằng kỹ thuật ELISA Sandwich, sử dụng kháng thể gắn bản là IgG thô kháng vi rút tinh chế và cộng hợp gắn enzyme HRPO trong nghiên cứu này sẽ là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo về loại vi rút mới xuất hiện ở Việt Nam. Chúng ta sẽ không phải nhập sinh phẩm từ nước ngoài cho những nghiên cứu về vi rút *Colti* nhóm B và các vi rút mới phát hiện khác. Việc tạo được sinh phẩm có độ nhạy, độ đặc hiệu và ổn định về hiệu giá sẽ giúp chúng ta chủ động trong giám sát dịch tễ học sự lưu hành của vi rút ở Việt Nam, góp phần đưa ra những định hướng để dự phòng bệnh có hiệu quả.

4.2.4. Những định hướng cho nghiên cứu tiếp theo

Trong những thập kỷ trước đây, có một số tác nhân vi rút mới xuất hiện rồi lại “im lặng” trong một khoảng thời gian dài gần 30 năm. Ví dụ như vi rút viêm não thung lũng Murray, xuất hiện ở châu Úc vào đầu những năm 1920 và lại tái xuất hiện vào năm 1951, hoặc vi rút gây sốt O’nyong nyong ở châu Phi “im lặng” trong khoảng thời gian giữa 1959 và 1996. Còn trong các thập kỷ gần đây, sự xuất hiện của vi rút Nipah gây HCNC cho bệnh nhân ở Malaysia vào năm 1999, nhưng từ năm 2009 cho đến nay chưa phát hiện thêm được trường hợp nào bị bệnh do vi rút Nipah. Hoặc nh vi rút SARS Corona, xuất hiện và lan truyền rất nhanh cho 32 nước trên thế giới

trong một thời gian rất ngắn với số người mắc bệnh khoảng 8437 và tử vong 813 (tính đến tháng 7 năm 2003).

Đối với vi rút *Colti* nhóm B, sự phát hiện thấy vi rút này ở Trung Quốc được ghi nhận trong rất nhiều năm từ sau năm 1987. Còn ở Việt Nam, vi rút được phát hiện đầu tiên từ bệnh nhân HCNC vào năm 2005. Ngoài ra, khi kiểm tra những mẫu phân lập vi rút từ muối ở miền Bắc từ năm 2002 cho đến năm 2008 cũng đều phát hiện thấy vi rút này. Như vậy, sự hiện diện và lưu hành rộng rãi của vi rút *Colti* nhóm B không những chỉ ở Việt Nam mà còn ở một số nước khác trong khu vực châu Á, cho thấy cần có những nghiên cứu để xác định sự lưu hành của vi rút *Colti* nhóm B và các loài muối truyền vi rút, cũng như vai trò gây bệnh của vi rút này ở Việt Nam.

NHỮNG HẠN CHẾ CỦA NGHIÊN CỨU

- Vi rút *Colti* nhóm B mới được phát hiện lần đầu tiên từ bệnh nhân ở Trung quốc năm 1987 và ở Việt Nam năm 2005 nên những nghiên cứu về vi rút học chưa được quan tâm đầy đủ. Đây là một khó khăn, thách thức đối với nhóm nghiên cứu vì thiếu sự trao đổi kinh nghiệm và tài liệu tham khảo.

- Vì thời gian có hạn nên mới chỉ theo dõi độ ổn định của bộ sinh phẩm trong thời gian 15 tháng, chưa đủ thời gian để thử nghiệm kéo dài để xác định độ ổn định của bộ sinh phẩm đến 24 – 30 tháng.

KẾT LUẬN

1. Đã chế tạo được IgG thổ kháng vi rút *Colti* nhóm B chủng 05VN255, cộng hợp IgG gắn enzyme peroxidase và từ đó chế tạo được bộ sinh phẩm ELISA sandwich phát hiện vi rút *Colti* nhóm B (vi rút Banna)

- Quy trình gây miễn dịch liều thấp nhắc lại nhiều lần với kháng nguyên tinh chế của vi rút *Colti* nhóm B chủng 05VN255 tạo hiệu giá kháng thể trong huyết thanh thổ cao trên 10000. IgG được tách chiết và tinh sạch từ huyết thanh thổ bằng phương pháp kết tủa với ammonium sulfate và sắc ký ái lực với protein G. Sản phẩm IgG thu được tương đối tinh khiết qua kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE; có hoạt tính mạnh và độ đặc hiệu cao với kháng nguyên vi rút *Colti* nhóm B khi đánh giá bằng kỹ thuật ELISA ở độ pha loãng 1/20000.

- Gắn được enzyme peroxidase hoạt hoá bằng natriperiodat lên kháng thể IgG. Cộng hợp IgG-HRPO tạo ra giữ được hoạt tính kháng thể và hoạt tính enzyme peroxidase.

- Sử dụng IgG tinh chế ở độ pha loãng 1/1600 làm kháng thể gắn bản và cộng hợp IgG-HRPO ở độ pha loãng 1/2000 làm kháng thể phát hiện tạo được bộ xét nghiệm ELISA sandwich phát hiện vi rút *Colti* nhóm B chủng 05VN255 với ngưỡng phát hiện là 10^3 PFU/ml và không phản ứng chéo với các vi rút Rota cùng họ Reoviridae và vi rút viêm não Nhật Bản khác họ.

2. Đã chế tạo được ba loạt sinh phẩm ELISA sandwich, đánh giá được độ ổn định và hiệu quả phát hiện vi rút *Colti* nhóm B của sản phẩm.

- Hoạt tính của bộ sinh phẩm ELISA giữ được ổn định sau 15 tháng bảo quản ở điều kiện thích hợp.

- Bước đầu ứng dụng bộ sinh phẩm phát hiện vi rút *Colti* nhóm B ở 72 mẫu phân lập từ một số tỉnh miền Bắc, miền Trung, miền Nam và Tây Nguyên. Hiệu quả phát hiện vi rút *Colti* nhóm B khi so sánh với kỹ thuật RT-PCR có độ phù hợp cao, kết quả đồng nhất 70/72 mẫu xét nghiệm (hệ số phù hợp Kappa = 0,94).

KIẾN NGHỊ

- Nên sử dụng sản phẩm đã chế tạo được trong nghiên cứu này bao gồm sinh phẩm và bộ sinh phẩm cho các kỹ thuật miễn dịch để tiếp tục nghiên cứu sự lưu hành, vectơ truyền và vai trò gây bệnh của vi rút *Colti* nhóm B ở Việt Nam.

- Cần nghiên cứu xây dựng dần mẫu chuẩn, để kiểm định bộ sinh phẩm ELISA Sandwich phát hiện kháng nguyên vi rút *Colti* nhóm B theo tiêu chuẩn chung, cũng như dần mẫu chuẩn để đánh giá năng lực xét nghiệm bằng kỹ thuật này cho mục đích phát triển kỹ thuật ở các phòng xét nghiệm khác.

24,1,2,23,22,3,4,21,20,5,6,19,18,7,8,17
16,9,10,15,14,11,12,13