

PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ KHÁNG TÁC SALMONELLA TYPHIMURIUM TRONG HUYẾT THANH Gà BẰNG KỸ THUẬT ELISA

Nguyễn Thị Trung, Trương Nam Hải

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Phương pháp ELISA phát hiện kháng thể kháng tác nhân gây bệnh trong huyết thanh vật chủ đang được sử dụng phổ biến trong sàng lọc cá thể đã và đang mang mầm bệnh trên quy mô lớn. Các kit ELISA được phát triển dựa trên kháng nguyên tái tổ hợp đặc hiệu đã được chứng minh là có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Trong công trình này, chúng tôi công bố các kết quả về việc sử dụng kháng nguyên roi tái tổ hợp F1jB2 của *S. typhimurium* đã được chứng minh là liên kết đặc hiệu với kháng thể kháng *S. typhimurium* để tạo kit ELISA. Với 100 ng rF1jB2 được phủ lên một giếng là thích hợp nhất trong thí nghiệm này kết hợp với mẫu huyết tương gà pha loãng 10^{-2} lần thì kết quả đạt được là tốt nhất. Ngưỡng dùng để phân biệt mẫu âm tính và mẫu dương tính của kit ELISA này là 0,096. ELISA kit được phát triển dựa vào việc sử dụng kháng nguyên rF1jB2 có độ nhạy là 100% và độ đặc hiệu là 100%. Bốn mươi lăm mẫu âm tính được kiểm tra bằng kit này đều thu được kết quả âm tính thực. 32 mẫu dương tính được kiểm tra cho kết quả tất cả là mẫu dương tính thực. Bộ mẫu huyết thanh đã biết trước là âm tính hay dương tính được sử dụng để kiểm tra sự ổn định và độ lặp lại của các kết quả thí nghiệm. Các kết quả thí nghiệm thu được ổn định đối với cả mẫu âm tính và dương tính khi thực hiện bằng bộ sinh phẩm này. Điều này có nghĩa rằng chúng ta nhận được cùng một kết quả nếu thử nghiệm một mẫu huyết thanh trên các giếng của một kit, hoặc trên các kit khác nhau.

Từ khóa: ELISA, *Salmonella typhimurium*, diagnostics, độ nhạy, độ đặc hiệu

MỞ ĐẦU

Salmonella typhimurium là một trong hai type huyết thanh *Salmonella* gây nên bệnh ngộ độc ở con người. Đầu của thập kỉ 70 chúng gây nhiễm chủ yếu ở người là *S. enteritidis*, nhưng đến đầu thập kỉ 90 thì chúng gây nhiễm là *S. typhimurium* (Anonymous 2000). Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới năm 2005 có tới 79% trong số các ca ngộ độc thực phẩm *Salmonella* là do *S. typhimurium* gây nên (WHO, 2005). Type huyết thanh này có khả năng truyền từ động vật sang người, chúng cũng có khả năng truyền từ người sang người (Galan, Curtiss, 1991; Baumler et al., 2000; Gast et al., 2002). *S. typhimurium* ký sinh chủ yếu ở gia cầm và thủy cầm, vì thế kiểm soát chặt chẽ gia cầm và thủy cầm nhiễm *Salmonella* là một việc làm hết sức cần thiết.

Các nhà khoa học đã phát triển các phương pháp phát hiện nhanh *S. typhimurium* trong mẫu thực phẩm, gia cầm và thủy cầm. Mỗi phương pháp đều có những ưu điểm và nhược điểm nhất định. Phương pháp ELISA sàng lọc kháng thể kháng *Salmonella* trong huyết thanh gà có thể thực hiện được nhiều mẫu một lúc, cho kết quả nhanh, nhạy nhưng độ đặc hiệu chưa cao (Prusak-Sochaczewski, Luong 1989).

Để cải thiện độ đặc hiệu các nhà nghiên cứu đã sử dụng kháng thể đơn dòng (Robinson et al., 1983; Smith, Jones, 1983) hoặc kháng nguyên tái tổ hợp (van Zijderveld et al., 1992) để tạo kit. Tiếp cận theo hướng nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu phát triển kit ELISA với nguyên liệu là kháng nguyên roi tái tổ hợp F1jB2.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Mẫu huyết tương

Mười hai mẫu huyết tương gà âm tính thu từ gà không nhiễm *Salmonella*; 45 mẫu huyết tương âm tính đối với *S. typhimurium*: 15 mẫu thu từ 15 gà không nhiễm *Salmonella*, 6 mẫu thu từ 6 gà được gây miễn dịch bằng protein tổng số của *E. coli*, 24 mẫu thu từ 24 gà được gây miễn dịch bằng protein tổng số của *S. enteritidis* và kháng nguyên roi tái tổ hợp từ *S. enteritidis* được sản xuất trong tế bào *E. coli* đã tinh sạch; 32 mẫu huyết tương gà dương tính được thu từ các gà gây miễn dịch bằng protein tổng số của *S. typhimurium* và protein kháng nguyên roi tái tổ hợp từ *S. typhimurium* sản xuất trong tế bào *E. coli* đã tinh

sạch. Tất cả các mẫu huyết tương nêu trên đều nhận được từ Trung tâm Động vật Thực nghiệm, Thụy Điển, các mẫu huyết tương trên đều được xác nhận tình trạng âm tính hoặc dương tính với *S. typhimurium* bằng thí nghiệm western blot.

Kháng nguyên rFljB2

Kháng nguyên rFljB2 có độ sạch trên 96% do Phòng Kỹ thuật di truyền, Viện Công nghệ sinh học tạo ra.

Phương pháp

Thí nghiệm ELISA

Thí nghiệm ELISA phát hiện kháng thể kháng *S. typhimurium* được tiến hành theo Eiji và đồng tác giả (2004) có cải tiến như mô tả của Nguyễn Thị Trung (2008) (Nguyễn Thị Trung, 2008; Nguyễn Thị Trung, Trương Nam Hải, 2008). Mỗi giếng của microplate được nhỏ 100 µl kháng nguyên đã pha loãng ở nồng độ thích hợp bằng dung dịch gần bán (1000 ml: 1,18 g Na_2CO_3 , 3,47 g NaHCO_3 , pH9,6), dùng nắp đậy kín và ủ ở 4°C trong 18 h. Rửa bán 3 lần bằng dung dịch rửa bán (1000 ml: 0,8 g NaCl, 0,02 g KCl, 0,115 g Na_2HPO_4 , 0,02 g KH_2PO_4 , pH7,3, 300 µl Tween 20), mỗi lần 200 - 300 µl/giếng. Bổ sung 100 µl 1% BSA vào mỗi giếng, ủ 60 phút ở 37°C trong buồng ẩm. Rửa bán 3 lần, bổ sung 100 µl huyết tương đã pha loãng vào mỗi giếng, ủ 60 phút ở 37°C. Rửa bán 5 lần, sau đó nhỏ vào mỗi giếng 100 µl TMB pha trong đệm acetate-citrate pH5,6. Bổ sung vào mỗi giếng 100 µl 1 N H_2SO_4 để dừng phản ứng. Đo OD ở bước sóng 450 nm bằng máy đọc ELISA. Xử lý số liệu bằng phần mềm Excel, so sánh với thông số của kit để đưa ra các kết luận về mẫu.

Xác định nồng độ kháng nguyên và độ pha loãng huyết thanh

Thí nghiệm được tiến hành theo Luyten và đồng tác giả (2004). Kháng nguyên tái tổ hợp được pha loãng thành 7 nồng độ: 1000, 500, 100, 50, 10, 1, 0,1 ng/ml. Nhỏ 100 µl/giếng theo hàng, nồng độ cao nhất ở hàng A, nồng độ giảm dần đến hàng G, hàng H là 1% BSA. Phiến nhựa được giữ ở trạng thái yên tĩnh ở 4°C, 16 h, sau đó được rửa 3 - 5 lần bằng dung dịch rửa bán. Huyết tương được pha loãng ở 11 độ

pha loãng: $5 \cdot 10^{-1}$, 10^{-2} , $2 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-2}$, 10^{-3} , $2 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-5} . Cột 1 nhỏ 100 µl 1% BSA, mỗi cột từ 2 đến 12 được nhỏ 100 µl huyết thanh theo độ pha loãng giảm dần. Các bước tiếp theo được tiến hành như các bước mô tả ở mục thí nghiệm ELISA.

Xác định ngưỡng phân biệt mẫu âm tính và dương tính

Thí nghiệm được tiến hành theo Luyten và đồng tác giả (2004). Các mẫu huyết tương được pha loãng ở nồng độ tối ưu và được phủ lên 3 giếng của một microplate. Thí nghiệm lặp lại trên 3 microplate khác nhau. OD ngưỡng = $\text{OD}_{\text{TBC}} (\text{trung bình chuẩn}) + 3 \text{SD}_{\text{TBC}}$. Yêu cầu: SD (Standard deviation-độ lệch chuẩn) và $\text{SD}_{\text{TBC}} \leq 0,1$ thì mẫu đạt yêu cầu kiểm định.

Độ ổn định của kết quả thí nghiệm đối với mẫu âm tính

Thí nghiệm được tiến hành theo Luyten và đồng tác giả (2004). Mỗi mẫu huyết thanh âm tính được lặp lại 10 lần trên một microplate và thực hiện trên 3 microplate khác nhau. Trên một microplate: tính toán giá trị SD và CV (Coefficient deviation - hệ số biến thiên) dựa vào giá trị OD, nếu $\text{SD} < 0,1$ và $\text{CV} < 0,1$ thì kết quả thí nghiệm có khả năng lặp lại. Giữa các microplate: tính toán giá trị SD chung và CV chung của một mẫu, nếu các giá trị này đều nhỏ hơn 0,1 thì kết quả thí nghiệm lặp lại.

Độ ổn định của kết quả thí nghiệm đối với mẫu dương tính

Quy trình thí nghiệm được tiến hành theo Luyten và đồng tác giả (2004). Mỗi mẫu được pha thành 6 độ pha loãng theo cấp số nhân. Một mẫu lặp lại 4 lần trên một microplate và thực hiện trên 3 microplate khác nhau. Trên một microplate: tính toán các giá trị SD, CV, nếu $\text{SD} < 0,1$ và $\text{CV} < 0,1$ thì kết quả thí nghiệm lặp lại trong một lần thí nghiệm. Giữa các microplate: giá trị SD chung và CV chung được tính toán, nếu các giá trị này nhỏ hơn 0,1 thì kết quả thí nghiệm có khả năng lặp lại giữa các lần thí nghiệm.

Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp

Thí nghiệm được tiến hành theo Luyten và đồng tác giả (2004). Độ nhạy (%) = $\frac{\text{Số dương tính thực}}{\text{Số dương tính}} \times 100\%$. Độ đặc hiệu (%) = $\frac{\text{Số âm tính thực}}{\text{Số âm tính}} \times 100\%$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

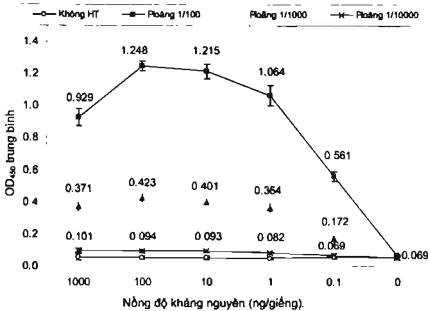
Tạo kit ELISA phát hiện kháng thể kháng *S. typhimurium*

Nồng độ kháng nguyên và độ pha loãng huyết tương tối ưu

Thực hiện thí nghiệm như đã mô tả trong phần phương pháp, chúng tôi dựng đồ thị mô tả mối tương quan của nồng độ kháng nguyên và một số độ pha loãng huyết tương gà (Hình 1).

Kết quả nhận được ở nồng độ kháng nguyên là 100 ng/giếng thì OD₄₅₀ đo được là lớn nhất là lớn

nhất đối với tất cả các độ pha loãng của huyết tương. Đối với độ pha loãng của huyết tương, các mẫu đặc hơn 10⁻² hoặc loãng hơn 10⁻³ đều cho giá trị OD₄₅₀ giảm rõ rệt, cụ thể tại độ pha loãng 10⁻³ giá trị OD₄₅₀ chỉ đạt gần 1/3 giá trị OD₄₅₀ của độ pha loãng 10⁻². Nồng độ kháng nguyên phù lên các giếng của microplate cũng ảnh hưởng rất lớn đến kết quả thu được. Các kết quả thu được khá ổn định trong khoảng nồng độ từ 1 đến 100 ng/giếng, tuy nhiên tại nồng độ kháng nguyên là 100 ng/giếng thì giá trị OD nhận được vẫn lớn nhất. Qua các giá trị OD thu nhận được, chúng tôi quyết chọn nồng độ kháng nguyên là 100 ng/giếng và độ pha loãng huyết thanh gà là 10⁻².



Hình 1. Đồ thị tương quan giữa nồng độ kháng nguyên và độ pha loãng huyết thanh gà. Đường trên cùng biểu thị giá trị OD₄₅₀ của mẫu huyết tương gà pha loãng 10⁻² với một số nồng độ kháng nguyên; Tương tự, đường thứ 2 từ trên xuống huyết tương gà pha loãng 10⁻³; đường thứ 3 từ trên xuống huyết tương gà pha loãng 10⁻⁴; đường dưới cùng không có huyết tương.

Xác định giá trị OD giới hạn giữa mẫu âm tính và mẫu dương tính

Mười hai mẫu huyết tương gà âm tính được sử dụng để xác định ngưỡng phân biệt mẫu âm tính và dương tính. Giá trị OD của các mẫu được đo làm cơ sở tính toán độ lệch chuẩn chung giữa các mẫu âm tính (Bảng 1)

Kết quả ở bảng 1 cho thấy giá trị OD của mẫu âm tính dao động trong một khoảng ngắn, từ 0,05

đến 0,094. Giá trị OD_{TBC} của tất cả các mẫu âm là 0,065 và giá trị SD tính toán được dựa trên giá trị OD là 0,011. OD giới hạn = OD_{TBC} + 3SD = (0,065 + 3 x 0,011) = 0,096. Với cách tính này sẽ có 99,9% các giá trị OD đo được thuộc khoảng giá trị đó và xác suất tin cậy là P<0,001. Nếu sử dụng bộ sinh phẩm này để phát hiện kháng thể kháng *S. typhimurium* trong huyết thanh gà, mẫu nào có giá trị OD lớn hơn 0,096 được kết luận là mẫu dương tính và nhỏ hơn 0,096 thì kết luận là mẫu âm tính,

Bảng 1. OD₄₅₀ của 12 mẫu huyết tương gà âm tính.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,075	0,058	0,055	0,061	0,059	0,059	0,059	0,056	0,054	0,057	0,054	0,057
B	0,076	0,055	0,055	0,061	0,072	0,062	0,070	0,060	0,062	0,053	0,052	0,053
C	0,061	0,058	0,050	0,066	0,067	0,061	0,059	0,060	0,057	0,056	0,054	0,054
D	0,083	0,059	0,054	0,066	0,071	0,065	0,063	0,062	0,060	0,056	0,053	0,054
E	0,084	0,066	0,057	0,070	0,079	0,077	0,075	0,078	0,071	0,063	0,060	0,064
F	0,094	0,067	0,056	0,076	0,075	0,091	0,070	0,076	0,061	0,062	0,057	0,058
G	0,076	0,066	0,052	0,068	0,071	0,099	0,072	0,068	0,063	0,061	0,054	0,054
H	0,088	0,064	0,060	0,087	0,083	0,085	0,070	0,072	0,063	0,061	0,058	0,055
OD _{TRC} :				0,065	SD chung:		0,011	OD ngưỡng:				0,096

$P < 0,001$

Kiểm soát chất lượng của sản phẩm

Độ ổn định của các kết quả thí nghiệm đối với mẫu âm tính

Khả năng lặp lại của các kết quả thí nghiệm khi thực hiện trên một microplate được kết luận thông qua các giá trị SD và CV.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy hầu hết SD và CV tính toán được đều nhỏ hơn 0,1 nên đạt yêu cầu kiểm định. Chỉ mẫu số 10/microplate 2, mẫu số 6 và 8/microplate 3 có CV lớn hơn 0,1. Nhưng sự sai khác đó không có ý nghĩa thống kê mà chỉ là sai số

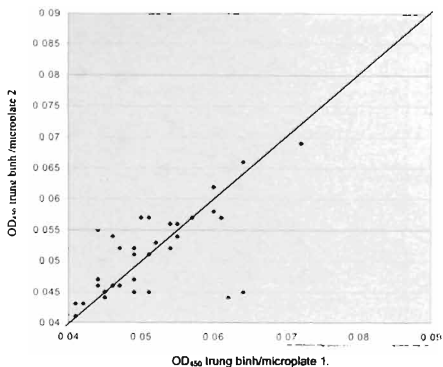
ngẫu nhiên, các giá trị SD tính toán được tại các vị trí này đều nhỏ hơn 0,01. Do vậy, mẫu âm tính cho kết quả ổn định khi thực hiện thí nghiệm trên một microplate trong một lần tiến hành thí nghiệm.

Các giá trị OD, SD chung và CV chung đều nhỏ hơn 0,1 nên kết quả thí nghiệm có khả năng lặp lại cao khi mẫu được thử nghiệm trên các microplate khác nhau (Bảng 3). Các chấm đen trên hình biểu thị mối tương quan về kết quả OD_{TRC} của một mẫu khi thực hiện trên hai microplate khác nhau (Hình 2). Các giá trị OD đều tập trung xung quanh đường xiên ($y = x$), như vậy các kết quả có khả năng lặp lại rất tốt.

Bảng 2. Giá trị SD và CV của mẫu âm tính trên từng microplate.

Mẫu số	Microplate 1			Microplate 2			Microplate 3		
	SD	CV	<0,1 ?	SD	CV	<0,1 ?	SD	CV	<0,1 ?
1	0,004	0,070	Đạt	0,005	0,091	Đạt	0,003	0,053	Đạt
2	0,006	0,087	Đạt	0,004	0,055	Đạt	0,007	0,090	Đạt
3	0,005	0,067	Đạt	0,005	0,064	Đạt	0,009	0,099	Đạt
4	0,007	0,094	Đạt	0,006	0,088	Đạt	0,005	0,059	Đạt
5	0,006	0,086	Đạt	0,008	0,094	Đạt	0,007	0,086	Đạt
6	0,004	0,061	Đạt	0,006	0,089	Đạt	0,008	0,101	Đạt
7	0,007	0,091	Đạt	0,005	0,053	Đạt	0,006	0,067	Đạt
8	0,006	0,078	Đạt	0,007	0,090	Đạt	0,008	0,101	Đạt
9	0,007	0,087	Đạt	0,003	0,034	Đạt	0,004	0,044	Đạt
10	0,005	0,074	Đạt	0,007	0,104	Đạt	0,006	0,083	Đạt
11	0,004	0,051	Đạt	0,008	0,097	Đạt	0,008	0,098	Đạt
12	0,005	0,070	Đạt	0,004	0,065	Đạt	0,003	0,044	Đạt

$P < 0,001$



Hình 2. Tương quan kết quả thí nghiệm của mẫu âm tính trên hai microplate khác nhau

Độ ổn định của các kết quả thí nghiệm đối với mẫu dương tính

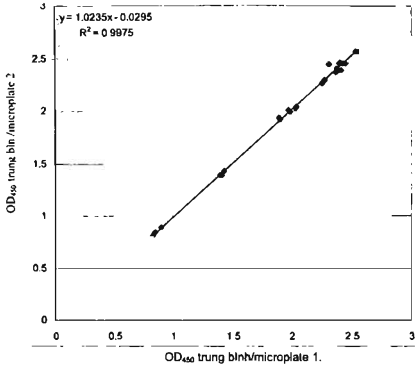
Mẫu huyết tương dương tính thu từ gà được gây miễn dịch bằng protein tổng số của *S. typhimurium* do đó hiệu giá kháng thể rất cao. Kết quả ở bảng 3 cho thấy giá trị OD không bị giảm

hiều sau khi pha loãng kháng thể 2 lần. Giá trị OD lớn nhất nhận được tại độ pha loãng 400 lần, nếu kháng thể bị pha loãng hơn 400 lần thì hiệu giá giảm. Tất cả các giá trị SD, CV, SD chung và CV chung tính toán được đều thỏa mãn yêu cầu là nhỏ hơn 0,1 chứng tỏ các kết quả thí nghiệm đều lặp lại ổn định.

Bảng 3. Giá trị SD và CV của mẫu huyết tương dương tính trên từng microplate

Độ pha loãng	Microplate 1			Microplate 2		
	OD _{TB}	SD	CV	OD _{TB}	SD	CV
1/100	1,852	0,043	0,023	1,881	0,044	0,023
1/200	2,298	0,086	0,037	2,345	0,078	0,033
1/400	2,368	0,072	0,030	2,381	0,092	0,039
1/800	2,320	0,086	0,037	2,335	0,088	0,038
1/1600	1,998	0,068	0,034	1,997	0,065	0,033
1/3200	1,385	0,041	0,029	1,378	0,046	0,033
1/6400	0,806	0,032	0,039	0,800	0,034	0,042
CV _{TB} < 0,1?			0,033			0,034
SD < 0,1 ?		0,032			0,064	
CV _{TBC} < 0,1 ?	0,033					
SD chung < 0,1 ?	0,063					

P < 0,001



Hình 3. Tương quan kết quả thí nghiệm của mẫu dương tính trên hai microplate khác nhau.

Mối tương quan của các kết quả thí nghiệm khi thực hiện trên các microplate được thể hiện ở hình 3. Các chấm màu đen thể hiện sự tương quan về giá trị, chúng ta nhận thấy có sự trùng khớp của kết quả thí nghiệm đối với mẫu thực hiện trên hai microplate. Các chấm này phân bố rất gần, thậm chí còn nằm ngay trên đường xiên tương quan trên hình. Các kết quả này một lần nữa khẳng định các kết quả thu được có khả năng lặp lại khi tiến hành trên các bộ sinh phẩm khác nhau.

Độ nhạy và độ đặc hiệu của kit ELISA

Sử dụng 45 mẫu huyết thanh âm tính đã được SVA kiểm nghiệm và xác nhận không chứa kháng thể kháng *S. typhimurium* và 32 mẫu huyết thanh có chứa kháng thể kháng *S. typhimurium* để xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của kit. Giá trị OD của các mẫu tại các vị trí được đo để tính toán giá trị SD, ngưỡng lý thuyết của mẫu âm tính và dương tính dựa vào giá trị OD. Các số liệu thu được được kiểm định theo tiêu chuẩn mẫu âm tính và mẫu dương tính.

Giá trị OD đo được từ các mẫu âm tính rất nhỏ, giá trị SD tính toán được cũng có giá trị rất nhỏ, nhỏ hơn nhiều so với giá trị 0,1. Vì thế, có thể kết luận rằng các kết quả thí nghiệm rất ổn định và sự sai khác không đáng kể. Đồng thời các giá trị OD

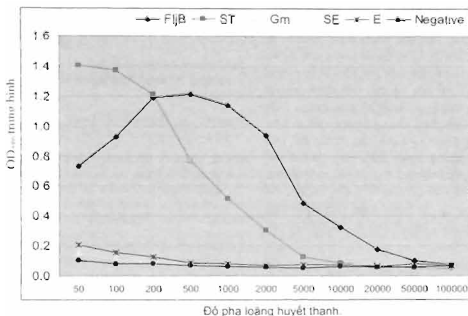
ngưỡng lý thuyết tính toán được dựa trên giá trị OD cũng nhỏ hơn so với giá trị 0,096, nên có thể khẳng định tất cả các mẫu âm tính được kiểm nghiệm đều âm tính thực.

Các mẫu dương tính trong thí nghiệm này đều cho giá trị OD rất cao, ngưỡng lý thuyết được tính toán và chỉ ra rằng giá trị này cao hơn nhiều lần so với 0,096. Bên cạnh đó, chúng tôi còn tính toán được tỉ lệ giữa OD ngưỡng lý thuyết/OD ngưỡng của kit làm cơ sở kết luận về mẫu cần kiểm định. Tỷ lệ OD ngưỡng lý thuyết/OD ngưỡng của kit tính toán được đều lớn hơn 1 nhiều lần, vì thế các mẫu dương tính được kiểm nghiệm là dương tính thực (Bảng 4).

Giá trị OD đo được từ các mẫu huyết thanh giả nhiễm *S. typhimurium*, *S. enteritidis* và *E. coli* khác biệt rất rõ ràng (Hình 4). Chỉ có các mẫu huyết thanh từ các gà gây miễn dịch bằng protein rFliB hoặc protein tổng số từ *S. typhimurium* mới có hiệu giá kháng thể cao. Còn các mẫu huyết thanh từ các gà gây miễn dịch bởi protein rGm hoặc protein tổng số từ *S. enteritidis* hoặc protein tổng số từ *E. coli* đều có hiệu giá kháng thể tương đương với huyết thanh từ gà không bị nhiễm. Do đó chúng ta có thể phân biệt được rõ ràng các gà nhiễm *S. typhimurium* với các gà nhiễm vi sinh vật khác bằng bộ sinh phẩm phát hiện đặc hiệu kháng thể kháng *S. typhimurium*.

Bảng 4. Độ nhạy và độ đặc hiệu của kit ELISA.

Dương tính thực	- 32	Dương tính giả	- 0	32
Âm tính giả	- 0	Âm tính thực	- 45	45
Tổng số dương tính	- 32	Tổng số âm tính	- 45	77
Độ nhạy của kit = $32/32 \times 100\% = 100\%$				
Độ đặc hiệu của kit = $45/45 \times 100\% = 100\%$				



Hình 4. Hiệu giá kháng thể trong huyết tương gà gây miễn dịch bằng một số kháng nguyên khác nhau.

THẢO LUẬN

Một thử nghiệm miễn dịch phải đủ nhạy để có thể vừa chẩn đoán sớm và chẩn đoán muộn được tình trạng nhiễm bệnh của một tác nhân. Thử nghiệm phải chẩn đoán được chính xác mầm bệnh cần phát hiện mà không bị phản ứng chéo với tác nhân khác thuộc cùng họ với tác nhân gây bệnh. Người sử dụng còn quan tâm đến thời gian, cách thức tiến hành và giá thành của sản phẩm. Các nghiên cứu trước đã chứng minh nếu dùng kháng nguyên thô hoặc kháng nguyên tinh chế từ chủng tự nhiên thì không thể tạo được những bộ sinh phẩm đạt tiêu chuẩn về độ nhạy và độ đặc hiệu. Vì thế muốn tạo được các bộ sinh phẩm có độ nhạy và độ đặc hiệu cao nên dùng kháng nguyên tái tổ hợp tinh sạch hoặc kháng thể đơn dòng. Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp tinh sạch, chúng đã được chứng minh là chỉ phản ứng với kháng thể đặc hiệu

bằng phương pháp Western blot. Nên chúng tôi đã nhận được kit ELISA có độ nhạy và độ đặc hiệu là 100%, trong một trường hợp khác chúng tôi nhận được kit ELISA có độ đặc hiệu 93,3% (Nguyễn Thị Trung, Trương Nam Hải, 2008). Nguyễn Trí Nhân, Trần Linh Thuộc cũng sử dụng kháng nguyên roi toàn bộ tái tổ hợp của *S. typhimurium* và *S. enteritidis* để tạo kit phát hiện *Salmonella* chung, kết quả là ngoài việc phát hiện được kháng thể kháng *Salmonella* còn hơn 20% phản ứng chéo với kháng thể kháng *E. coli*. Năm 1992, van Zijderveld và đồng tác giả đã tạo ra Kit ELISA dùng kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên roi H:g,m của *S. enteritidis* đạt độ nhạy và độ đặc hiệu là 100%. Một số công trình nghiên cứu khác công bố nếu dùng kháng thể đơn dòng hoặc kháng nguyên tái tổ hợp sẽ cải thiện được độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp. Như vậy, kit ELISA mà chúng tôi tạo ra có độ nhạy và độ đặc hiệu cao không phải là một trường hợp ngoại lệ. Thứ nhất, chúng tôi sử

dụng kháng nguyên roi tái tổ hợp đặc hiệu *S. typhimurium* tinh sạch làm nguyên liệu tạo kit phát hiện kháng thể kháng *S. typhimurium*. Thứ hai, chúng tôi đã xác định được nồng độ kháng nguyên thích hợp được sử dụng trong phản ứng nên không xảy ra hiện tượng nhiễu do thừa hoặc thiếu kháng nguyên. Thứ ba, số lượng mẫu được dùng trong thí nghiệm này còn nhỏ, độ đa dạng của mẫu chưa cao. Trong số 45 mẫu âm tính đối với *S. typhimurium* có 15 mẫu thu từ các gà không nhiễm *Salmonella*, 6 mẫu dương tính với *E. coli*, 24 mẫu dương tính với *S. enteritidis*. Bộ sinh phẩm này cơ bản đã đáp ứng được nhu cầu chẩn đoán nhanh và chính xác kháng thể kháng *S. typhimurium* trong huyết thanh của gia cầm. Điều này một lần nữa khẳng định rằng chúng tôi đã tối ưu hóa và sản xuất được nguồn kháng nguyên dùng trong sản xuất bộ sinh phẩm. Nói tóm lại, chiến lược lựa chọn kháng nguyên tái tổ hợp là đúng đắn, nhưng chọn epitope nào và độ dài của epitope đó là bao nhiêu hoàn toàn phụ thuộc vào mục đích cuối cùng của thí nghiệm. Nếu kit đạt được cả hai chỉ tiêu độ nhạy và độ đặc hiệu đều cao thì rất tốt, ngược lại chúng ta cần phải quan tâm đến sàng lọc chính xác hay là sàng lọc tất cả các vật chủ có thể đang mang mầm bệnh.

Một điều nữa cần phải quan tâm cho các sản phẩm cần được sử dụng trong thương mại là phải kiểm soát được chất lượng của mỗi sản phẩm trước khi xuất xưởng. Ở Mỹ và một số quốc gia khác người ta có những quy định nghiêm ngặt trong việc kiểm tra sản phẩm trong quá trình sản xuất và xuất xưởng để tránh những biến động về kết quả thí nghiệm của một mẫu khi thực hiện trên sản phẩm của một lô hoặc các lô sản xuất khác nhau (Morgan, 1998; Luyten *et al.*, 2004). Vì thế trong công trình này chúng tôi đã ứng dụng quy trình kiểm soát sản phẩm của Luyten và đồng tác giả (2004) để kiểm tra sản phẩm kit ELISA. Các kết quả nhận được cho thấy rằng kit ELISA chúng tôi tạo ra đã đáp ứng được các yêu cầu như có độ nhạy, độ đặc hiệu cao, kết quả hoàn toàn có khả năng lặp lại trên một micoplate cũng như trên các microplate khác nhau đối với cả mẫu âm tính và mẫu dương tính.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu được chúng tôi rút ra một số kết luận như sau: chúng tôi đã tạo được kit ELISA phát hiện đặc hiệu kháng thể kháng *S. typhimurium* có độ nhạy và độ đặc hiệu là 100% bằng việc sử dụng kháng nguyên roi tái tổ hợp F1jB2. Các bộ sinh phẩm này cho kết đúng và chính xác khi sử dụng bộ mẫu âm tính và dương tính chuẩn để thử nghiệm. Các kết quả thí nghiệm có khả năng lặp lại cao khi

kiểm chứng theo giá trị SD và CV dựa vào OD đo được từ thực nghiệm.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bằng kinh phí tài trợ của Tổ chức SIDA thông qua Dự án VS/BT3 "Sản xuất các protein tái tổ hợp sử dụng trong y học và nông nghiệp. Công trình có sự đóng góp số trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anonymous (2000) *Research on Salmonella enteritidis*, In September 8 Public Meeting, Atlanta, GA: Food and Drug Administration.
- Baumler AJ, Hargis BM, Tsoilis RM (2000) Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. *Science* 287: 50-52.
- Eiji K, Mizue S, Naoko A, Takashi K (2004) Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantifying antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein to detect subclinical infections in vaccinated horse. *J Clin Microbiol* 42(11): 5087-5093.
- Forschner E, Lehmacher W (1992) ELISA-systems for surveillance programs of animal infectious diseases: Optimization by pretesting and safety definition of production serials. *Dtsch Tierarztl Wschr* 99: 87-91.
- Galan JE, Curtiss R (1991) Distribution of the *invA*-B-C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infect Immun* 59: 2901-2908.
- Gast RK, Nasir MS, Jolley ME, Holt PS, Stone HD (2002) Serologic detection of experimental *Salmonella enteritidis* infections in laying hens by fluorescence polarization and enzyme immunoassay. *Avian Dis* 46(1): 137-142.
- Luyten K, Goris N, Crij A-B, de Clercq K (2004) Serial release testing for FDM ELISA kits: necessary of official control. *Global FMD situation 2003-2004*: 407-414.
- Morgan AP (1998) Regulation control of veterinary diagnostic test kits. *Rev Sci Off Epiz* 17(2): 562-567.
- Nguyễn Thị Trung (2008) Nghiên cứu biểu hiện các kháng nguyên tái tổ hợp đặc hiệu *S. enteritidis* và *S. typhimurium* để tạo bộ sinh phẩm (kit) chẩn đoán *Salmonella*. Luận án Tiến sĩ sinh học. Viện Công nghệ sinh học.
- Nguyễn Thị Trung, Trương Nam Hải (2008) Chẩn đoán nhanh, đặc hiệu kháng thể kháng *Salmonella* Enteritidis trong huyết thanh gà bằng kỹ thuật ELISA sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(4A): 751-756.
- Nguyễn Trí Nhân, Trần Linh Thuộc (2005) Tổng hợp kháng nguyên H:1,2 toàn phần tái tổ hợp của *Salmonella*

typhimurium. Tap chí Khoa học và Công nghệ 3(4): 429-438.

Prusak-Sochaczewski E, Luong JHT (1989) Utilization of two improved enzyme Immunoassays based on avidin-biotin interaction for the detection of *Salmonella*. *National Research Council Proceedings. Canada* 89: 321-327.

Robinson BJ, Pretzman CI, Matting JA (1983) An enzyme immunoassay using myeloma protein for detection of

Salmonellae. *Appl Environ Microbiol* 45: 1816.

Smith AM, Jones C (1983) Use of murine myeloma protein M467 for detecting *Salmonella* species in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 826.

van Zijderveld FG, van Zijderveld-van Bammel AM, Annakotia J (1992) Comparison of four different enzyme-linked immunosorbent assays for serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* infections in experimentally infected chickens. *J Clin Microbiol* 30(10): 2560-2566.

DETECTING ANTIBODIES AGAINST *SALMONELLA TYPHIMURIUM* IN CHICKEN SERA BY ELISA KIT

Nguyen Thi Trung, Truong Nam Hai*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Using ELISA technique to detect antibodies against pathogen factors in host serum is the popular method to screen both acute and latent infection in large scale. ELISA kits based on recombinant antigen have confirmed their high specificity and sensitivity. In this paper we reported the results of using *S. typhimurium* recombinant antigen - FliJb2 specific-binding to antibody in chicken sera to construct ELISA kit. The optimal results were released from 100 ng of rFliJb2 antigen coated per well combination with 100 times in dilution chicken sera. The cut off OD value of the kit to discriminate negative from positive sample was 0.096. The ELISA kit based on our rFliJb2 antigen had 100% of sensitivity and 100% of specificity. Forty five negative samples tested by the kit showed true negative results, and 32 positive samples all gave true positive results. The kit serials were also tested for repeatability and reproducibility of tested sera samples. The obtained results showed that the kit released stable results in both of negative and positive sera samples. It means that the same results were obtained for one sample when it was applied on a microplate as well as on different serials.

Keywords: *Diagnostcs, ELISA, Salmonella typhimurium, sensitivity, specificity*