

# KIỂM ĐỊNH BỘ SINH PHẨM (ELISA KIT) CHẨN ĐOÁN NHANH, ĐẶC HIỆU KHÁNG THỂ KHÁNG *Salmonella enteritidis* TRONG HUYẾT THANH GÀ

NGUYỄN THỊ TRUNG, ĐỖ THỊ HUYỀN, JAN-CHRISTER JANSON, TRƯƠNG NAM HẢI

## 1. MỞ ĐẦU

Trong sản xuất, việc các bộ sinh phẩm cùng được tạo ra trong một lô cho các kết quả thử nghiệm khác biệt vẫn thường xảy ra. Chính vì thế, việc kiểm tra các bộ sinh phẩm trước khi đưa ra thị trường là điều rất cần thiết để đảm bảo rằng các bộ sinh phẩm có chất lượng như nhau, đáng tin cậy. Đồng thời, các kết quả kiểm tra trước khi sản phẩm xuất xưởng sẽ chỉ ra được chính xác các chỉ số về độ nhạy và độ đặc hiệu của lô hàng [2]. Các quốc gia đều thiết lập nên các hệ thống kiểm định chất lượng sản phẩm cho các sản phẩm thương mại. Ở các nước như Mỹ và Canada, tất cả các bộ sinh phẩm đều phải được kiểm tra về độ nhạy, độ đặc hiệu, khả năng cho kết quả ổn định để được cấp chứng chỉ trước khi lưu hành [4].

Trong công trình này các mẫu huyết thanh gà đã biết chắc chắn chứa hoặc không chứa kháng thể kháng *S. enteritidis* được dùng để kiểm định một số thông số của bộ sinh phẩm như độ ổn định của bộ sinh phẩm, tính đúng, tính chính xác, kiểm định mẫu dương tính và mẫu âm tính.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu

Bộ sinh phẩm (ELISA kit) chẩn đoán nhanh, đặc hiệu kháng thể kháng *S. enteritidis* trong huyết thanh gà dùng để kiểm định có các thông số như sau: mỗi giếng của microplate được phủ 100 ng kháng nguyên tái tổ hợp Gm. Giá trị OD dùng để phân biệt mẫu âm tính và dương tính là 0,106. Độ nhạy của bộ sinh phẩm là 100% và độ đặc hiệu là 93,3%.

Gà thí nghiệm thuộc loại gà sạch dùng làm thí nghiệm (CFS, Chicken free from *Salmonella*) do Trung tâm Động vật Thú y Thủy Điền cung cấp.

Mẫu huyết thanh âm tính: hai mẫu huyết thanh thu từ các con gà CFS. Mẫu huyết thanh dương tính: hai mẫu huyết thanh thu từ các con gà được gây miễn dịch với protein tổng số của *S. enteritidis*.

Mẫu huyết thanh âm tính và dương tính đều được kiểm tra tình trạng chứa hoặc không chứa kháng thể kháng *S. enteritidis* bằng phương pháp Western blot trước khi tiến hành các thí nghiệm ELISA.

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Thí nghiệm ELISA

Kỹ thuật ELISA phát hiện kháng thể được tiến hành theo Eiji và đồng tác giả (2004) [1] có cải tiến như mô tả của Nguyễn Thị Trung (2008). Các microplate đã được gắn bản bằng kháng

nguyên tái tổ hợp đặc hiệu *S. enteritidis* và bảo quản ở 4°C. Dùng pipet nhỏ 100 µl mẫu huyết thanh gà đã pha loãng vào mỗi giếng, ủ 60 phút ở nhiệt độ 37°C. Rửa bàn 5 lần, sau đó nhỏ vào mỗi giếng 100 µl dung dịch kháng thể kháng IgG của gà cộng hợp enzyme peroxidase, ủ 60 phút ở nhiệt độ 37°C. Rửa bàn 5 lần, sau đó nhỏ vào mỗi giếng 100 µl dung dịch chất hiện màu, phản ứng xảy ra trong thời gian từ 10 - 60 phút ở nhiệt độ phòng, trong điều kiện không có ánh sáng. Bổ sung vào mỗi giếng 100 µl dung dịch 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> để dừng phản ứng. Đo OD ở bước sóng 450 nm bằng máy đọc ELISA. Xử lí số liệu bằng phần mềm Excel, so sánh với thông số của kit để đưa ra các kết luận về mẫu.

### 2.2.2. Kiểm định mẫu âm tính và dương tính

Thí nghiệm được tiến hành theo Luyten *et al.* 2004. Đối với mẫu âm tính: các mẫu âm tính thường có giá trị OD nhỏ, nên OD lí thuyết = OD trung bình chung + 3SD trung bình chung. Nếu mẫu có tỉ số OD lí thuyết/OD ngưỡng < 1 thì mẫu âm tính thực, ngược lại là dương tính giả. Đối với mẫu dương tính: các mẫu dương tính thường có giá trị OD lớn, nên OD lí thuyết = OD trung bình chung - 3SD trung bình chung. Nếu tỉ số OD lí thuyết/OD ngưỡng > 1 thì mẫu dương tính thực, ngược lại là âm tính giả.

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

Thí nghiệm được tiến hành theo Luyten *et al.* 2004 [3]. 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 (Standard deviation-độ lệch chuẩn) và CV (Coefficient deviation - hệ số biến thiên) dựa vào giá trị OD. Nếu giá trị SD và CV tính được đều nhỏ hơn 0,1 thì các 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 các kết quả thí nghiệm lặp lại tốt.

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

Quy trình thí nghiệm được tiến hành theo Luyten *et al.* 2004 [3]. 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 và nếu chúng đều nhỏ hơn 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.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kiểm định mẫu âm tính và dương tính

#### 3.1.1. Kiểm định mẫu âm tính

Chúng tôi sử dụng hai mẫu huyết thanh gà âm tính để tiến hành thí nghiệm. Các mẫu huyết thanh này đã được SVA kiểm tra bằng phương pháp Western blot và xác nhận không chứa kháng thể kháng *S. enteritidis*. Các thí nghiệm được tiến hành như mô tả trong phần nguyên liệu và phương pháp. Các kết quả thu được cho thấy, giá trị OD trung bình chung thu được từ các mẫu khá thấp. Giá trị này nằm trong khoảng 0,059 đến 0,089. Đồng thời giá trị SD chung tính toán được rất nhỏ, từ giá trị 0,000 đến 0,009. Chính vì thế mà tỉ số giữa OD ngưỡng lí thuyết/OD ngưỡng của kit luôn luôn nhỏ hơn giá trị 1. Hai mẫu huyết thanh âm tính được kiểm tra bằng bộ sinh phẩm này đã cho kết quả âm tính thực.

### 3.1.2. Kiểm định mẫu dương tính

Các mẫu huyết thanh chứa kháng thể kháng *S. enteritidis* được thu từ các con gà được gây miễn dịch thực nghiệm bằng protein tổng số của *S. enteritidis*. Ngoài ra, các mẫu huyết thanh này còn được khẳng định chứa kháng thể kháng *S. enteritidis* bằng phương pháp Western blot. Các thí nghiệm cũng được tiến hành như đã mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu. Các giá trị OD trung bình chung và SD chung được tính toán để làm cơ sở tính toán giá trị OD ngưỡng lý thuyết. Công thức tính OD ngưỡng đã được nêu và giải thích trong phần phương pháp. Các giá trị OD trung bình chung tính toán được đều khá cao, từ 0,335 đến 1,456. Chính vì thế mà giá trị SD cũng cao hơn phần mẫu âm tính, từ 0,030 đến 0,096. Tuy nhiên sự chênh lệch của giá trị SD vẫn nằm trong khoảng giá trị cho phép (SD của các mẫu nhỏ hơn 10%). Tỉ số giữa OD ngưỡng lý thuyết/OD ngưỡng của kit khá cao, đều lớn hơn giá trị 4. So sánh với các tiêu chuẩn cần thiết để xác nhận là mẫu dương tính thì các mẫu này đều cho kết quả thỏa mãn các yêu cầu kiểm định. Vì thế, chúng là các mẫu dương tính khi kiểm tra bằng bộ sinh phẩm này.

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

#### 3.2.1. Thí nghiệm đối với một microplate

Quy trình tiến hành thí nghiệm, cách tính toán các giá trị và các tiêu chuẩn được thực hiện như mô tả ở phần phương pháp. Các giá trị OD được đo và làm cơ sở để tính toán giá trị SD và CV. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 1. Các giá trị SD và CV trình bày trong bảng 1 đều có xu hướng nhỏ hơn 0,1 và đạt yêu cầu kiểm định. Tuy nhiên, giá trị CV của mẫu số 1 ở microplate 3 lớn hơn giá trị 0,1. Chúng tôi đã sử dụng phương pháp so sánh hai cặp số liệu để kiểm tra lại kết quả này. Kết quả phân tích chỉ ra rằng sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê. Như vậy, tất cả các huyết thanh gà âm tính đều thỏa mãn yêu cầu kiểm định. Nghĩa là, tất cả các mẫu thí nghiệm đều cho kết quả ổn định khi kiểm tra bằng bộ sinh phẩm phát hiện đặc hiệu kháng thể kháng *S. enteritidis*.

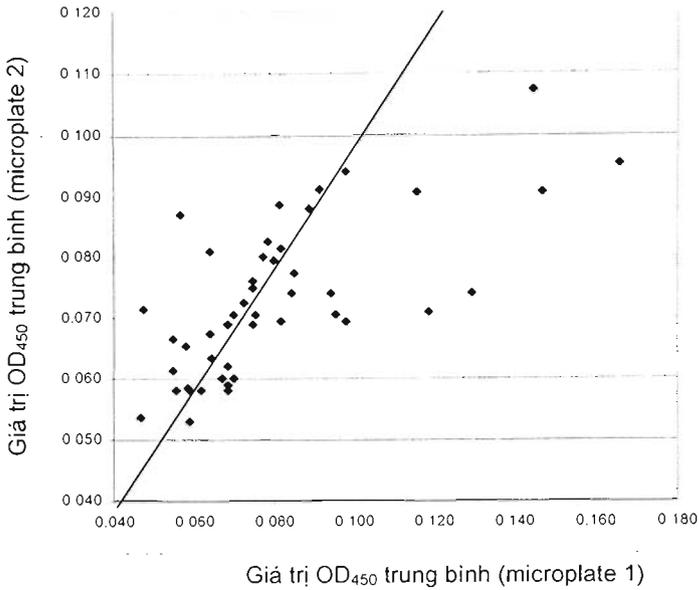
Bảng 1. Giá trị SD và CV trên từng microplate đối với từng mẫu âm tính

Mẫu số	Microplate 1			Microplate 2			Microplate 3		
	SD	CV	< 0,1?	SD	CV	< 0,1?	SD	CV	< 0,1?
1	0,003	0,038	Đạt	0,004	0,040	Đạt	0,008	0,101	Đạt
2	0,007	0,096	Đạt	0,007	0,091	Đạt	0,005	0,077	Đạt

P < 0,001.

#### 3.2.2. Thí nghiệm đối với các microplate

Bên cạnh đó, chúng tôi cũng kiểm tra khả năng lặp lại của các kết quả thí nghiệm khi được tiến hành trên các microplate khác nhau. Công việc này còn được gọi là xác định độ chính xác của kết quả thí nghiệm. Độ chính xác cũng được xác định thông qua các giá trị SD và CV. Các giá trị SD chung và CV chung được tính toán dựa vào các giá trị OD đo được của mẫu đó trên các microplate.



Hình 1. Mối tương quan của kết quả thí nghiệm đối với các mẫu âm tính được thực hiện trên hai microplate

Phân tích các giá trị OD, SD chung và CV chung tính toán được chúng tôi thấy các kết quả thí nghiệm có khả năng lặp lại cao khi mẫu được thử nghiệm trên các microplate khác nhau. Tất cả các giá trị SD và CV tính được đều nhỏ hơn 0,1. Sự tương quan giữa giá trị OD của mẫu khi thực hiện trên hai microplate khác nhau được trình bày ở hình 1. Các chấm trên hình biểu thị mối tương quan về kết quả OD trung bình của một mẫu khi thực hiện trên hai microplate khác nhau. Trục hoành biểu diễn giá trị OD của mẫu thu được khi tiến hành thí nghiệm trên microplate 1. Trục tung biểu thị giá trị OD của mẫu thu được khi tiến hành thí nghiệm trên microplate 2. Như vậy, đối với hai microplate khác nhau ta có một điểm biểu diễn giá trị OD của mẫu trên đồ thị. Kết quả trên hình chỉ ra rằng các giá trị OD tương quan hầu như tập trung xung quanh đường xiên, chứng tỏ các kết quả có khả năng lặp lại rất tốt. Tuy nhiên, có một số kết quả nằm lệch về phía bên phải của đường xiên tương quan, nhưng khi các giá trị này được phân tích và kiểm định tính sai khác thì không thấy có sự sai khác có ý nghĩa thống kê. Vì thế, các giá trị vẫn được chấp nhận, các kết quả thí nghiệm hoàn toàn có khả năng lặp lại khi được thực hiện trên các microplate khác nhau.

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

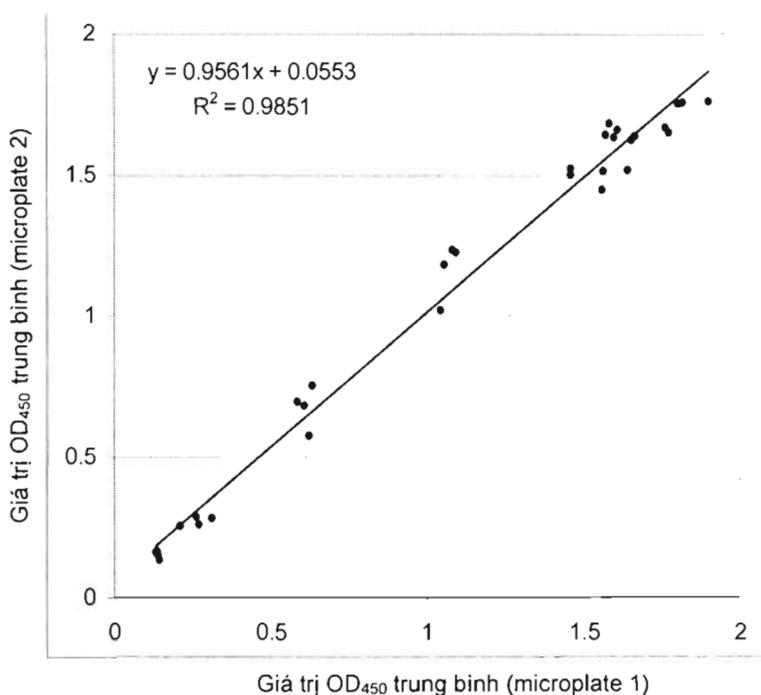
#### 3.3.1. Thí nghiệm đối với một microplate

Mẫu dương tính được dùng để kiểm nghiệm có hiệu giá kháng thể cao, vì thế sau một bước pha loãng gấp đôi thì giá trị OD đo được không bị giảm nhiều. Chúng tôi cũng nhận thấy rằng giá trị OD trung bình tại mẫu huyết thanh bị pha loãng 50 lần nhỏ hơn giá trị OD trung bình tại độ pha loãng 100 lần. Từ độ pha loãng 100 lần đến độ pha loãng 800 lần thì giá trị OD trung bình nhận được từ hai microplate giảm không đáng kể. Điều này chứng tỏ hàm lượng kháng thể kháng *S. enteritidis* tồn tại trong huyết thanh rất cao. Từ độ pha loãng 1600 lần trở lên giá trị OD đo được

giảm đáng kể sau một bước mẫu bị pha loãng gấp đôi đối với cả hai microplate. Tuy nhiên các giá trị SD, CV tính toán được đều nhỏ hơn 10% và thỏa mãn yêu cầu kiểm định. Chứng tỏ các kết quả thí nghiệm đối với các mẫu dương tính đều lặp lại ổn định.

### 3.3.2. Thí nghiệm đối với các microplate

Chúng tôi cũng sử dụng các mẫu huyết thanh để kiểm tra khả năng cho kết quả ổn định khi thực hiện trên các microplate khác nhau. Các giá trị OD từ các mẫu trên các microplate được đo và tính toán giá trị OD trung bình. Mỗi tương quan về giá trị OD trung bình thu được từ một mẫu thí nghiệm được biểu diễn thông qua đồ thị hàm tương quan. Toàn bộ các kết quả thí nghiệm được trình bày trên hình 2. Các giá trị OD trung bình tính toán được đối với các mẫu khi tiến hành trên 2 microplate khác nhau gần như trùng khớp lên nhau. Sự trùng khớp về kết quả được thể hiện là chúng có xu hướng cùng nằm trên đường xiên tương quan. Các kết quả này một lần nữa khẳng định các mẫu dương tính cùng cho một kết quả khi tiến hành trên các microplate khác nhau. Nghĩa là các bộ sinh phẩm đều có độ chính xác cao.



Hình 2. Mối tương quan của kết quả thí nghiệm đối với mẫu dương tính được kiểm tra bằng hai microplate

Từ những kết quả nhận được chúng tôi rút ra một số kết luận: kết quả thí nghiệm thu được từ một mẫu thí nghiệm chính xác và ổn định khi được thực hiện trên các microplate khác nhau. Giá trị SD và CV tính toán dựa vào giá trị OD của mẫu dương tính và mẫu âm tính đều thỏa mãn các yêu cầu kiểm định. Bộ sinh phẩm hoàn toàn có khả năng ứng dụng để sàng lọc bước đầu sự nhiễm *S. enteritidis* trên các đàn gà. Những con gà mà huyết thanh chứa kháng thể kháng *S. enteritidis* phải được kiểm tra lại bằng phương pháp vi sinh hoặc sinh học phân tử để có kết luận cuối cùng về tình trạng nhiễm *S. enteritidis*.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Eiji K., Mizue S., Naoko A., Takashi K. - 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) (2004) 5087-5093.
2. Forschner E., Lehmacher W. - ELISA-systems for surveillance programs of animal infectious diseases: Optimization by pretesting and safety definition of production serials, Dtsch Tierarztl Wschr. **99** (1992) 87-91.
3. Luyten K., Goris N., Caij A-B, de Clercq K. - Serial release testing for FDM ELISA kits: necessary of official control, Global FMD situation 2003-2004, 2004, pp. 407-414.
4. Morgan A. P. - Regulation control of veterinary diagnostic test kits, Rev. Sci. Off Epiz. **17** (2) (1998) 562-567.
5. Nguyễn Trí Nhân, Trần Linh Thuớc - Tổng hợp kháng nguyên H:1,2 toàn phần tái tổ hợp của *Salmonella typhimurium*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ **42** (4) (2005) 429-438.
6. Nguyễn Thị Trung - 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, 2008, pp. 50-51.

## SUMMARY

### SERIAL RELEASE TESTING FOR FAST, SPECIFIC KIT THAT DETECTING ANTIBODIES AGAINST *Salmonella enteritidis* IN CHICKEN SERA

It is necessary to test some parameters of kit that detecting fast, specifically antibodies against *S. enteritidis* in chicken sera before commercialization to avoid excessive variation between serials. Two chicken sera samples containing antibodies against *S. enteritidis* (positive sample) and 2 chicken sera negative samples were used for our experiment. This kit had 100% of sensitivity and 93.3% of specificity. The cut-off line of this kit was 0.106. The SD and CV was calculated base on OD mean value. The obtained results shown that the calculated SD was below 10%. The theoretical cut-off to the kit cut-off had been to lower than 1 with the negative samples, while this ratio gave from positive samples always higher than 4. Therefore, all of the tested negative sera samples and positive sera samples were released the results satisfactory. At the same time, the kit serials were also tested for repeatability and reproducibility of tested sera samples. The obtained results shown that this kit was released very stable results in both of negative and positive sera sample. It means that the same results were obtained for one sample when it was applied on a microplate but also on different serials.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 22 tháng 4 năm 2009

Viện Công nghệ sinh học,

Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.