

PHÁT TRIỂN PHƯƠNG PHÁP ELISA KHẢO SÁT NHIỄM *STREPTOCOCCUS SUIIS* SỬ DỤNG KHÁNG NGUYÊN PROTEIN BỀ MẶT 1 (SURFACE ANTIGEN ONE)

Trần Thị Bích Chiêu¹, Võ Minh Hoa¹, Phan Nhã Uyên¹, Trần Mạnh Hùng², Nguyễn Văn Vĩnh Châu³, Ngô Thị Hoa¹

¹Trung tâm Bệnh nhiệt đới, Đơn vị nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford tại Việt Nam

²Trường Đại học Y Dược, Thành phố Hồ Chí Minh

³Bệnh viện Bệnh nhiệt đới, Thành phố Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài: 29.9.2015

Ngày nhận đăng: 17.11.2015

TÓM TẮT

Streptococcus suis (*S. suis*) là một trong những tác nhân gây bệnh quan trọng nhất trong viêm màng não mũ cấp trên người lớn tại Việt Nam và một số nước châu Á như Thái Lan, Hong Kong. Chúng tôi khảo sát khả năng phát triển phương pháp ELISA chẩn đoán đặc hiệu sử dụng protein bề mặt của *S. suis* SAO làm kháng nguyên. Kháng thể kháng protein SAO được sản xuất trên mô hình thỏ nhằm mục đích sử dụng trong xây dựng qui trình ELISA kiểu mẫu. *S. suis* và các tác nhân vi trùng khác được dùng trong phản ứng ELISA để xác định độ đặc hiệu và độ nhạy của qui trình. Nhằm đánh giá khả năng ứng dụng trong khảo sát huyết thanh học trên người, qui trình ELISA được đánh giá hiệu quả với mẫu huyết thanh của bệnh nhân. Qui trình ELISA kiểu mẫu được xác định với nồng độ kháng nguyên SAO-M phù giềng tối ưu là 0.1mg/giềng, nồng độ pha loãng của huyết thanh thỏ chứa kháng thể kháng SAO-M và của kháng thể thứ cấp lần lượt là 1:500 và 1:10000. Huyết thanh thỏ chứa kháng thể kháng SAO-M có độ đặc hiệu 100% với hiệu giá kháng thể là 1:16000. Qui trình ELISA kiểu mẫu có độ đặc hiệu 95% và độ nhạy 90% khi thử nghiệm trên huyết thanh người được xác định nhiễm với *S. suis* hay với các tác nhân phổ biến khác gây bệnh viêm màng não mũ tại Việt Nam. Kết quả nghiên cứu khẳng định thành công bước đầu trong việc xây dựng qui trình ELISA chẩn đoán nhiễm *S. suis*, và cho thấy tiềm năng ứng dụng trong tương lai.

Từ khóa: Bệnh lây nhiễm giữa động vật và người, Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), protein SAO, *Streptococcus suis*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Streptococcus suis (*S. suis*), hay còn gọi là liên cầu khuẩn heo là tác nhân gây bệnh cho người có nguồn gốc lây nhiễm từ động vật. Heo được xem là ký chủ tự nhiên và là nguồn lây nhiễm chính cho người. Bệnh trên người do *S. suis* gây ra bao gồm viêm màng não mũ (VMNM), nhiễm trùng huyết, viêm cơ tim, viêm thân đốt sống, viêm khớp (Gottschalk *et al.*, 2007; Segura *et al.*, 2014). Đa số các ca bệnh trên người xảy ra tại các nước châu Á và tác nhân này có thể gây dịch bệnh trên người với tỷ lệ tử vong cao (17,7%) và nhanh do sức độc tố gây suy đa cơ quan. Trong số gần 1600 ca bệnh được báo cáo trên thế giới, hơn 500 ca bệnh đã được báo cáo tại Việt Nam (Huong *et al.*, 2014; Mai *et al.*, 2008; Wangkaew *et al.*, 2006; Wertheim *et al.*, 2009a; Wertheim *et al.*, 2009b). Di chứng thường gặp trên hơn 60% bệnh nhân phục hồi sau VMNM do *S. suis* là tình trạng giảm thính lực từ nhẹ như ù tai đến điếc

hoàn toàn cả 2 tai (Huong *et al.*, 2014). Tiếp xúc nghề nghiệp với heo và thịt heo cũng như tiêu thụ sản phẩm từ heo chưa nấu kỹ hay còn sống được xác định là yếu tố nguy cơ của nhiễm *S. suis* trên người (Nghia *et al.*, 2011). Nhiễm *S. suis* không triệu chứng lâm sàng trên nhóm người có nghề nghiệp tiếp xúc với heo tại các nước phát triển thay đổi từ 1%-21% (Elbers *et al.*, 1999, Robertson, Blackmore, 1989, Strangmann *et al.*, 2002). *S. suis* được chứng minh là tác nhân bội nhiễm phổ biến (15%) trên heo bị bệnh tai xanh tại Việt Nam (Hoa *et al.*, 2013). Điều này cho thấy khả năng nhiễm trùng *S. suis* trong nhóm nghề nghiệp tiếp xúc heo hay thịt heo thường xuyên tại Việt Nam là không nhỏ và có khả năng nhiều dạng bệnh nhẹ do *S. suis* xảy ra trong cộng đồng chưa được xác định. Tuy nhiên, hiện nay chưa có phương pháp chẩn đoán đặc hiệu đã được khảo sát hiệu lực nhằm có thể ứng dụng trong khảo sát huyết thanh học trong cộng đồng. Gen mã hóa cho protein SAO được xác định hiện diện trên 344/

346 (99,48%) chủng *S. suis* phân lập từ người và heo tại Việt Nam, trong đó biến thể gen *saom* được xác định là phổ biến nhất (Chiêu *et al.*, 2014). Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển và đánh giá hiệu quả của phương pháp ELISA sử dụng kháng nguyên là protein bề mặt 1 (surface antigen one, SAO) (Li *et al.*, 2007) của *S. suis*.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thu nhận và tinh sạch protein SAO-M

Đoạn gen *saom* được khuếch đại, tạo dòng vào vector biểu hiện pET30a(+) và biến nạp vào *E. coli* BL21DE3 *plysS* (Novagen) như đã mô tả trước đây (Chiêu *et al.*, 2014). Chi tiết bao gồm vector pET30a(+) mang gen mã hóa cho protein SAO theo đúng khung đọc mở sẽ được biến nạp sốc nhiệt vào tế bào biểu hiện BL21DE3 *plysS* khả nạp theo quy trình hóa biến nạp với calcium, biểu hiện như hướng dẫn của nhà cung cấp (Novagen) và protein mong đợi được biểu hiện vượt mức. Khuẩn lạc được nuôi trong môi trường LB lỏng được ủ qua đêm ở 37°C và lắc với tốc độ 200 rpm. Dịch nuôi cấy được pha loãng 100 lần trong môi trường LB có chứa kanamycine vào sáng hôm sau và tiếp tục được nuôi ở cùng điều kiện đến khi OD_{600nm} đạt 0,4 - 0,6. Dịch nuôi cấy được bổ sung IPTG đến nồng độ cuối cùng là 1 mM, và được tiếp tục ủ ở 25°C trong 6 tiếng tiếp theo. Toàn bộ dịch nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 8000 rpm trong 15 phút ở 4°C để thu nhận toàn bộ sinh khối vi khuẩn. Sinh khối của vi khuẩn được giữ ở -20°C cho đến khi thực hiện quy trình tinh sạch protein.

Quy trình tinh sạch protein bằng cột Nickel theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ni-NTA Agarose, Invitrogen). Chuẩn bị cột Nickel: trộn đều hỗn hợp agarose Ni-NTA và lấy 1,5 ml hỗn hợp cho vào cột tinh sạch 10 ml, để lắng các hạt agarose trong cột bằng cách giữ yên cột trong 5-10 phút. Sau đó, nhẹ nhàng bỏ dịch nổi và rửa cột bằng cách bổ sung 6 ml nước cất vô trùng vào cột; đảo và gõ nhẹ lên thành cột khoảng 5 lần. Tiếp tục để cột lắng bằng cách để yên cột trong 5-10 phút, sau đó, nhẹ nhàng bỏ dịch nổi. Bổ sung 6 ml dung dịch đệm gắn kết biến tính (Denaturing Binding Buffer) pH 7,8 (8M Urea, 20 mM Sodium Phosphate pH 7,8, 500 mM NaCl) vào cột, đảo và gõ nhẹ cột khoảng 5 lần. Tiếp tục để cột lắng bằng cách để yên cột trong 5-10 phút.

Huyền phù vi khuẩn có chứa protein SAO trong pha hòa tan được chuẩn bị theo các bước

sau. Tế bào từ dịch nuôi cấy 50 ml dịch nuôi cấy được thu nhận bằng ly tâm với 8000 rpm trong 20 phút ở 4°C hay sử dụng tế bào đã được thu nhận trước và được lưu giữ ở -20°C. Sau đó, hoà tế bào trong 8 ml dung dịch đệm gắn kết biến tính và phá vỡ tế bào sử dụng máy tán siêu âm. Tán siêu âm hỗn dịch tế bào trên đá theo chu kỳ 30 giây tán siêu âm và 30 giây nghỉ trong 3 phút. Ly tâm hỗn dịch ở tốc độ 8000 rpm trong 20 phút ở 4°C để loại mảnh vỡ tế bào và chuyển dịch nổi có chứa protein SAO hòa tan sang ống mới. Bổ sung 8 ml dịch chứa protein đã được chuẩn bị ở trên vào cột chứa agarose đã được gắn nickel đã được chuẩn bị. Trộn nhẹ hỗn dịch trong cột agarose nickel bằng máy đảo trộn, ở nhiệt độ 4°C trong 30 - 60 phút để protein bám vào hạt agarose nickel. Để hỗn dịch trong cột agarose Nickel lắng tự nhiên và loại dịch nổi khỏi cột và giữ lại dịch nổi để điện di SDS-PAGE kiểm tra hiệu suất tinh sạch protein. Bổ sung 2-4 ml dung dịch đệm rửa biến tính (pH 6,0) (8 M Urea, 20 mM Sodium Phosphate pH 6,0, 500 mM NaCl) để rửa cột và để hỗn dịch lắng tự nhiên, sau đó loại bỏ dịch nổi khỏi cột và lặp lại bước rửa cột như trên 2 lần. Tách protein ra khỏi cột bằng dung dịch đệm hòa tan biến tính (Denaturing Elution Buffer) pH 4,0 (8 M Urea, 20 mM Sodium Phosphate pH 4,0, 500 mM NaCl). Thu nhận các phân đoạn hòa tan chứa protein SAO tinh sạch. Protein thu được từ cột nickel sẽ tiếp tục được tinh sạch qua gel SDS PAGE, nhuộm gel với dung dịch Coomassie Blue. Vùng gel chứa phân đoạn protein có kích thước phù hợp (~110 KDa) sẽ được cắt rời, sau đó nghiền nát trong nitrogen lỏng và hòa tan trong dung dịch PBS rồi ly tâm (8000 rpm/15 phút/4°C) để thu nhận dịch nổi. Sau đó dùng máy ly tâm chân không làm khô dung dịch và giữ protein ở 4°C đến khi dùng thì hòa tan vào dung dịch PBS.

Protein SAO sau khi tinh sạch qua SDS PAGE sẽ được kiểm tra chất lượng trên gel SDS-PAGE một lần nữa và kiểm tra với kháng thể kháng Histidine bằng phương pháp Western blot và nhuộm bạc (Biorad, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau cùng, hàm lượng protein SAO thu được sẽ được định lượng bằng phương pháp Bradford theo kit DC protein assay (5000112, Biorad, Mỹ) (theo hướng dẫn của nhà sản xuất) với đường chuẩn được xây dựng bằng cách sử dụng albumin huyết thanh bò (BSA) ở các nồng độ khác nhau trong khoảng 0,25 - 1,5 mg/ml. Dung dịch protein được bảo quản với hỗn hợp ức chế protease (Sigma FAST protease inhibitor tablet) với nồng độ cuối là 250 ul/ 1,5 mg protein.

Tạo kháng thể kháng SAO xây dựng qui trình ELISA

Tạo kháng thể đa dòng trên thỏ: SAO protein tinh sạch được sử dụng để tạo kháng thể đa dòng trên thỏ trắng New Zealand. Kháng thể đa dòng được tạo theo quy trình chuẩn 90 ngày của công ty Thermal scientific (<http://www.pierce-antibodies.com>). Bốn con thỏ được bắt đầu tiêm khoảng 5-7 tuần tuổi (1,8 – 2 kg) bao gồm một con thỏ đối chứng và ba con thỏ gây đáp ứng miễn dịch với protein SAO. Quá trình gây miễn dịch bao gồm một lần chích khởi đầu và 3 lần chích nhắc, với lần chích nhắc 1 cách lần chích khởi đầu 2 tuần và 2 lần chích sau (lần 3 và 4) cách lần trước 1 tháng. Protein SAO tinh sạch với hàm lượng 250 ug sẽ được trộn với chất bổ trợ miễn dịch complete Freund's adjuvant (CFA) (Sigma) với tỷ lệ thể tích 1:1 để được thể tích cuối cùng 1ml và được chích vào dưới da thỏ. Hỗn hợp PBS và CFA được sử dụng để làm chuẩn âm trên thỏ đối chứng trong suốt quá trình gây đáp ứng miễn dịch ở thỏ. Hai tuần sau lần chích đầu tiên, thỏ sẽ được tiêm nhắc với hỗn hợp gồm 100ug SAO protein và incomplete Freund adjuvant (IFA) (Sigma). Khoảng 3 - 5 ml máu thỏ sẽ được thu trước khi tiêm protein (T0) và cách 2 tuần sau mỗi lần tiêm nhắc (T1, T2, T3) và tách huyết thanh sau khi để máu đông tại nhiệt độ phòng, huyết thanh sẽ được lưu giữ tại tủ đông -20°C. Sau lần tiêm nhắc cuối cùng thỏ, kháng thể sẽ được kiểm tra và 10 -15 ml máu thỏ sẽ được thu nhận qua vein tai mỗi tuần trong 5 tuần và sau đó thỏ được thả nuôi ngoài đồng.

Quy trình ELISA được phát hiện kháng thể kháng SAO-M:

Đĩa 96 giếng (Costar) được ủ qua đêm ở 4°C với protein SAO-M (1 ug/ml) hoà trong 100 mM carbonate-bicarbonate buffer, pH 9,6 (Sigma) ở thể tích 100 µl/giếng. Đĩa được rửa 3 lần với buffer phosphate saline tween 20 (0,05%) (PBS-tween 20). Mẫu huyết thanh thỏ được pha loãng với tỷ lệ 1:500 trong PBS-Tween 20 được thêm vào giếng với thể tích 100 µl/giếng và ủ ở 37°C trong 1 giờ. Mẫu chứng âm trong phản ứng ELISA là mẫu huyết thanh được thu nhận từ thỏ được gây miễn dịch với PBS và chất bổ trợ (Freund Adjuvant, Sigma). Ngoài ra các mẫu huyết thanh thu nhận tại thời điểm T0 (trước khi tiêm protein SAO) cũng được dùng làm đối chứng khi cần thiết. Đĩa được rửa lại 3 lần với PBS-tween 20. Chuẩn bị kháng thể thứ cấp kháng IgG thỏ với độ

pha loãng 1:10000 và bổ sung vào giếng với thể tích 100 µl/giếng và ủ ở 37°C trong 1 giờ. Đĩa được rửa lại 3 lần với PBS-tween 20. Bổ sung 100 µl/giếng chất hiển thị màu (TMB) và ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Phản ứng được kết thúc bằng 50 µl/giếng dung dịch tạm dừng phản ứng H₂SO₄ 1N. Đo độ chiết quang ở bước sóng 450nm bằng máy đọc Optical Density (model 680XR, Biorad).

Giá trị ngưỡng (cut-off) trong phản ứng ELISA được xác định bằng công thức $Cut-off = X + SD * f$ (Andreas Frey *et al.*, 1998). Trong đó, X là tổng số mẫu được thực hiện như chứng âm; SD là độ lệch chuẩn của kết quả của các lần lặp lại của từng mẫu, f là hệ số.

Đánh giá độ nhạy và đặc hiệu của kháng thể bằng phương pháp ELISA

Đối tượng thí nghiệm: Mẫu huyết thanh của bốn thỏ đã được tiêm protein SAO và thỏ đối chứng tiêm PBS. Các chủng vi sinh dùng trong thí nghiệm bao gồm *S. pyogenes*, *E. coli* (ATCC 25922), *H. influenza* (ATCC 49297), *S. aureus* (ATCC 33591), *N. meningitidis* và *S. pneumonia*(ATCC 49619), *S. suis*. Ngoài ra protein SAO-M và 2 protein tinh sạch bề mặt khác của *S. suis* cũng được sử dụng..

Các chủng vi sinh được tăng sinh trên đĩa thạch thích hợp sau 18h và thu toàn bộ sinh khối. Sau khi được phá vỡ tế bào hoàn toàn bằng tán siêu âm như trên, nồng độ protein tổng số được đo bằng phương pháp Bradford assay. Protein tổng số, protein SAO-M được gắn lên bề mặt đĩa ELISA costar 96 giếng và quy trình ELISA được tiến hành như trên.

Đánh giá độ đặc hiệu và độ nhạy của phương pháp ELISA

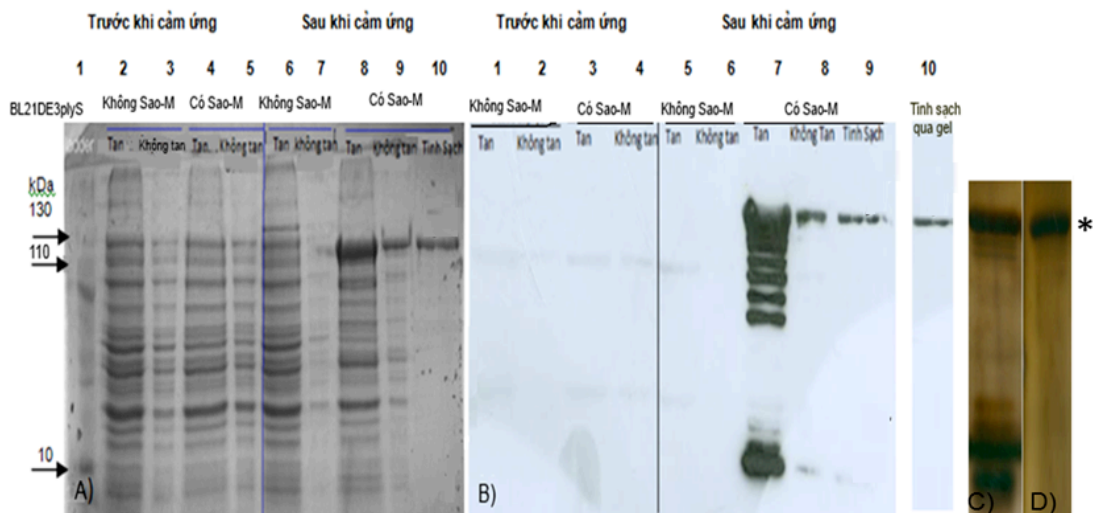
Thực hiện quy trình ELISA như trên với sự thay đổi như sau: mẫu huyết thanh bệnh nhân được sử dụng như kháng thể thứ cấp và sử dụng ở nồng độ pha loãng 1:50 trong dung dịch pha loãng mẫu PBS-Tween 1% và kháng thể thứ cấp là kháng thể kháng IgG người được pha loãng ở nồng độ 1:15000. Bốn mươi mẫu huyết thanh thu nhận từ bệnh nhân được xác định nhiễm *S. suis* (20) và các tác nhân khác *S. suis* (20) bằng nuôi cấy và khuếch đại DNA, được thu nhận trong nghiên cứu trước được đưa vào sử dụng sau khi đã được hội đồng y đức Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Thành phố Hồ Chí Minh phê duyệt cho phép thực hiện.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thu nhận protein SAO-M tinh sạch

Protein SAO-M kích thước khoảng 110 KDa đã được biểu hiện vượt trội thành công sau khi được cảm ứng bằng IPTG và phần lớn nằm trong pha tan (Chiêu *et al.*, 2014) (Hình 1A, giếng 8). Protein SAO-M tái tổ hợp (~110 KDa) được thu nhận từ protein tổng trong pha hòa tan bằng phương pháp sắc ký ái lực giữa nhóm 6 aminoacid Histidine với nickel qua cột (Hình 1A, giếng 10). Tuy nhiên khi kiểm tra bằng Western blot sử dụng kháng thể kháng histidine, kết quả cho thấy có sự hiện diện với hàm lượng thấp của phân đoạn protein có kích thước nhỏ khoảng 10 KDa (Hình 1B, giếng 8,9). Phân đoạn này có thể là một đoạn protein không đặc hiệu nhưng có chứa histidine dẫn đến có ái lực với nickel và được tinh sạch cùng với protein SAO-M. Hoặc là sản phẩm kích thước nhỏ của

protein SAO-M được tạo ra liên tục do protein SAO-M không bền. Do vậy để kiểm tra các giả thiết trên và để có protein có độ tinh sạch cao sử dụng trong gây đáp ứng miễn dịch thỏ và làm kháng nguyên trong phương pháp ELISA sau này, chúng tôi tiếp tục tinh sạch protein, đã tinh sạch qua cột nickel, bằng cách sử dụng phương pháp tinh sạch qua gel SDS PAGE. Kết quả Western blot cho thấy sau khi tinh sạch qua gel SDS PAGE, sản phẩm protein SAO-M chỉ chứa protein có kích thước ~130 KDa (Hình 1B, giếng 10). Nghĩa là phân đoạn protein kích thước nhỏ (10KDa) không phải là sản phẩm không bền của SAO-M mà là một sản phẩm ngoại nhiễm qua quá trình tinh sạch bằng cột nickel. Kết quả nhuộm bạc cho thấy độ tinh sạch protein SAO-M sau khi tinh sạch qua cột nickel chưa cao (Hình 1C) nhưng sau tinh sạch qua gel thì đạt >95% (Hình 1D). Hàm lượng protein SAO-M đạt kết quả 3,2 mg/100 ml dịch nuôi cấy dựa theo phương pháp Bradford.



Hình 1. Biểu hiện, thu nhận và tinh sạch protein SAO-M tái tổ hợp. **A)** Kết quả điện di SDS-PAGE (A) protein của tế bào *E. coli* BL21DE3plyS mang vector biểu hiện pET30a(+). Giếng 1: thang protein (Thermo scientific 10-250 kDa). Giếng 2-9: protein tổng trước và sau khi cảm ứng biểu hiện vượt mức trong tế bào *E. coli* BL21DE3plyS chứa vector pET30a(+) có hay không mang gen SAOM được thu nhận trong hai pha tan và không tan. Giếng 10: protein SAOM sau khi tinh sạch qua cột Nickel. **B)** Kết quả lai Western blot với kháng thể kháng đười là aa Histidin (Sigma) và protein của tế bào *E. coli* BL21DE3plyS mang vector biểu hiện pET30a(+)(không có (giếng 1,2 ,5 và 6) và có chứa gen SAOM (giếng 3,4, 7-9). Protein SAO M tồn được phát hiện trong pha không tan của tế bào (giếng 8), tuy nhiên hàm lượng không sao như trong pha tan (giếng 7). Giếng 10 là mẫu protein SAO sau khi được tinh sạch qua gel SDS PAGE. Kết quả nhuộm bạc protein tái tổ hợp SAO sau khi tinh sạch qua cột nickel **(C)** và sau khi đã tinh sạch thêm một lần nữa qua gel SDS PAGE **(D)**. *: vị trí của SAO- M protein được biểu hiện vượt mức.

Xác định nồng độ tối ưu của kháng nguyên SAO-M trong phản ứng ELISA

Nhằm xác định nồng độ kháng nguyên protein

SAO tối ưu cho phản ứng ELISA, protein SAO-M sau tinh sạch ở trên được chuẩn bị với nhiều nồng độ khác nhau trong khoảng 0,25 ug/ml đến 10 ug/ml (Hình 2) trong dung dịch phủ. Các dung dịch protein

này được dùng để phủ trên các giếng khác nhau trong đĩa ELISA. Huyết thanh thô gây đáp ứng miễn dịch với protein SAO-M và thô đối chứng được dùng như kháng thể thứ nhất trong các giếng tương ứng với nồng độ pha loãng thử nghiệm ban đầu là 1:500. Kháng thể kháng IgG thô được dùng như kháng thể thứ cấp với độ pha loãng thử nghiệm ban đầu như hướng dẫn của nhà sản xuất là 1:10000.

Kết quả thu được sau 3 lần lặp lại thí nghiệm cho thấy có sự gia tăng giá trị OD cùng với sự gia tăng nồng độ kháng nguyên và đạt giá trị cực đại tại nồng độ 1 - 2 ug/ml. Giá trị OD không thực sự khác biệt đáng kể giữa phản ứng ELISA sử dụng 1 mg/ml và 2 mg/ml của protein SAO-M. Với nồng độ kháng nguyên cao hơn 2 ug/ml, giá trị OD của các phản ứng tương đương không tăng đáng kể và có khuynh hướng giảm dần. Do đó, chúng tôi chọn nồng độ kháng nguyên tối ưu sẽ là 1 ug/ml/ giếng sử dụng trong phản ứng ELISA (Hình 2).

Kết quả các phản ứng ELISA sử dụng kháng nguyên protein SAO với nồng độ thay đổi từ 0,25 mg/ml - 10 ug/ml. Kháng thể sơ cấp là huyết thanh được thu nhận sau lần chích nhắc thứ III từ thô gây miễn dịch với protein SAOM (◆) hoặc với PBS (■) được sử dụng với nồng độ pha loãng 1:500. Kháng thể thứ cấp là kháng thể dê gắn HRP kháng IgG thô có độ pha loãng 1:10.000.

Xác định độ pha loãng tối ưu của kháng thể thứ cấp kháng IgG thô dùng trong phản ứng ELISA

Độ pha loãng khác nhau của kháng thể thứ cấp gắn horse raddish peroxidase (HRP) kháng IgG thô trong khoảng từ 5.000 đến 60.000 lần được thử nghiệm trong ba lần lặp lại của phản ứng ELISA. Kết quả của phản ứng ELISA cho thấy giá trị OD_{450nm} của các phản ứng với mẫu âm có giá trị gần bằng 0 (Hình 3), trong khi các mẫu dương cho giá trị giảm dần từ OD_{450nm} 0,994 đến OD_{450nm} 0,177 theo độ pha loãng của kháng thể thứ cấp tăng dần (hình tròn, Hình 3). Nhằm xác định độ pha loãng tối ưu của kháng thể thứ cấp, tỷ lệ giá trị OD của mẫu dương trên mẫu âm tại cùng độ pha loãng (P/N ratio) được xác định, ở độ pha loãng nào mà tỷ lệ P/N cho giá trị cao nhất thì độ pha loãng đó sẽ được xác nhận là độ pha loãng tối ưu. Tỷ lệ giá trị OD giữa mẫu dương và mẫu âm ở độ pha loãng 10.000 của kháng thể thứ cấp là 70 và là giá trị cao nhất

(OD của mẫu dương: 0,910; OD của mẫu âm: 0,014) (Bảng 1). Do đó, độ pha loãng 10.000 của kháng thể thứ cấp là độ pha loãng tối ưu được sử dụng trong các phản ứng ELISA trong các thí nghiệm về sau.

Đáp ứng miễn dịch trên thô tiêm protein SAO

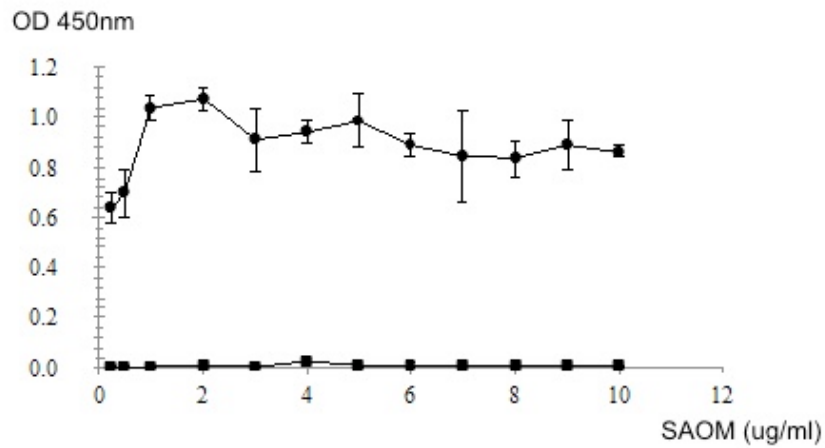
Hiệu giá kháng thể của một mẫu được xác định là độ pha loãng cao nhất của mẫu (được quy đổi ra giá trị logarite của cơ số 2 vì pha loãng theo dãy nhân đôi) mà vẫn có giá trị OD_{450nm} của phản ứng ELISA là dương tính (so sánh với giá trị OD_{450nm} ngưỡng được xác định dựa trên giá trị OD_{450nm} của phản ứng ELISA được thực hiện với các mẫu chứng âm, Bảng 2) (Andreas Frey *et al.*, 1998).

Các mẫu huyết thanh thu nhận từ 3 thô ở thời điểm T0 và sau các lần tiêm nhắc được dùng trong phản ứng ELISA với kháng nguyên protein SAO-M với độ pha loãng 1:500 để đánh giá sự đáp ứng miễn dịch của thô với protein SAO-M trên thô. Kết quả phản ứng ELISA của ba lần lặp lại cho thấy giá trị OD_{450nm} rất thấp tại thời điểm trước khi tiêm SAO-M vào dưới da thô gây đáp ứng miễn dịch (T0), so với các giá trị OD của phản ứng ELISA sử dụng huyết thanh thô thu nhận tại các thời điểm sau chích nhắc lần 1, 2 và 3 (T1, T2, và T3) (Hình 4). Ngoài ra, các giá trị OD cũng có khuynh hướng tăng dần trong các phản ứng sử dụng huyết thanh thu nhận từ thời điểm chích nhắc lần 1 đến lần 3 (T1 đến T3). Như vậy, kết quả cho thấy cả 3 thô không chứa kháng thể kháng protein SAO-M tại thời điểm T0 và đã có đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể kháng protein SAO-M sau khi tiêm gây đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với SAO-M. Tuy nhiên, thô 3 có lượng kháng thể sinh ra thấp hơn 2 thô còn lại và khuynh hướng tăng dần không rõ ràng trong huyết thanh thu nhận từ T1 và T2 (Hình 4). Mặt khác, thô 3 chết trước khi thu nhận huyết thanh lần 3 do vậy chúng tôi không thể khảo sát được huyết thanh thô 3 từ trong cả 3 lần để đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch của thô 3.

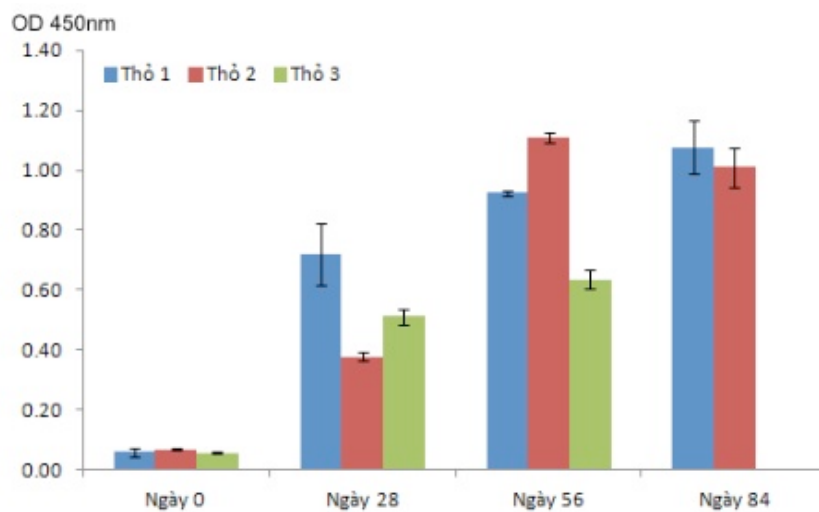
Lượng kháng nguyên được sử dụng trong phản ứng ELISA là 100 ug/giếng. Kháng huyết thanh thô được dùng tại độ pha loãng 1:500 và kháng thể dê kháng IgG thô được pha loãng 1:10.000. Thô 3 bị chết trước lần tiêm nhắc thứ 3.

Bảng 1. Tỷ lệ giá trị OD giữa kết quả mẫu dương và mẫu âm (P/N) của phản ứng ELISA tại các độ pha loãng khác nhau của kháng thể thứ cấp.

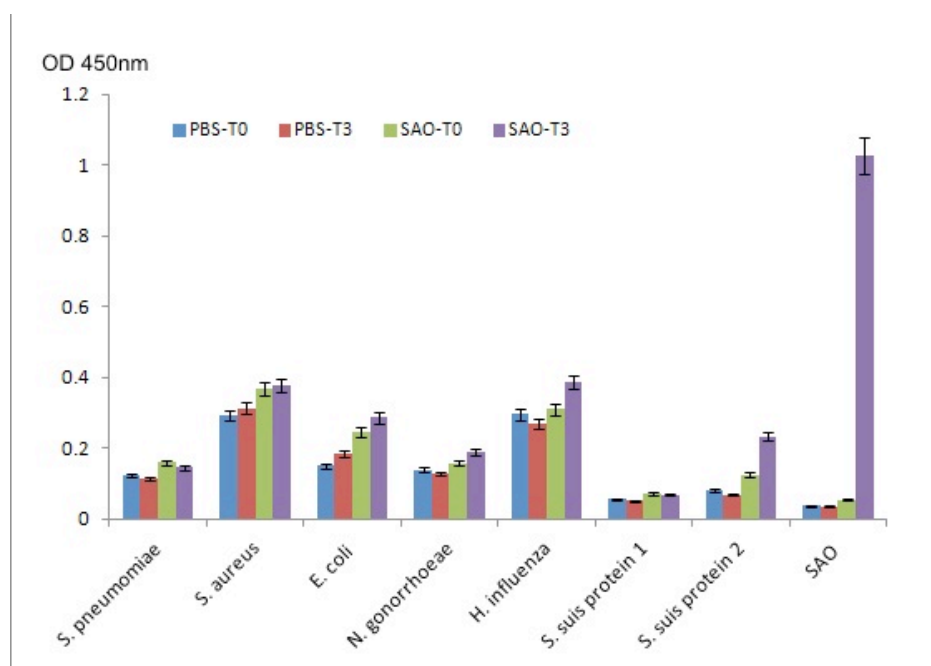
Độ pha loãng	Giá trị OD trung bình		Giá trị OD trung bình		P/N
	(mẫu dương)	SD	(mẫu âm)	SD	
5000	0,994	0,063	0,02	0,002	49,7
10000	0,910	0,045	0,013	0,001	70,0
20000	0,477	0,042	0,008	0,003	59,5
30000	0,385	0,037	0,012	0,003	31,2
40000	0,244	0,005	0,006	0,007	43
50000	0,214	0,012	0,005	0,004	39,1
60000	0,177	0,033	0,007	0,006	26,5



Hình 2. Kết quả phản ứng ELISA xác định nồng độ tối ưu của kháng nguyên SAOM.



Hình 3. Khảo sát đáp ứng miễn dịch của thỏ được gây miễn dịch với protein SAO-M



Hình 4. Sự đặc hiệu của kháng thể IgG đặc hiệu kháng protein SAO của *S. suis* trong mẫu huyết thanh thỏ trước (T0) và sau (T3) khi gây miễn dịch. T0: Thời điểm lấy máu trước khi bắt đầu quá trình gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ. T3: Thời điểm lấy máu cuối cùng, lần 3- ngày 83, trong qui trình gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ

Hiệu giá kháng thể đa dòng thu nhận từ thỏ kháng protein SAO trong phản ứng ELISA

Giá trị ngưỡng (cut-off) của phương pháp ELISA được xác định là giá trị 0,091 với bước sóng OD_{450nm} và ở độ tin cậy 99% (Bảng 2). So sánh giá trị OD_{450nm} với ngưỡng này trong các phản ứng ELISA, hiệu giá kháng thể log₂ của các mẫu huyết thanh, thu nhận từ các thời điểm khác nhau của ba thỏ và sử dụng trong phản ứng ELISA, thay đổi từ 10 - 14 tức là tương đương với mẫu huyết thanh được

pha loãng từ 8000 lần đến 128000 lần (Bảng 3). Trong đó, hiệu giá kháng thể của thỏ 1 tăng dần từ lần thu mẫu máu đầu tiên và đạt giá trị pha loãng cao nhất tại thời điểm T3. Thỏ 2 có hiệu giá kháng thể T1 rất thấp (<10), tăng cao hơn vào thời điểm T2 (12, đạt độ pha loãng 32,000) nhưng lại giảm nhẹ đi vào thời điểm T3 (11, ~ độ pha loãng 16000). Hiệu giá kháng thể của thỏ 3 sau 2 lần lấy máu 1 và 2 thấp và không gia tăng (10). Như vậy, thỏ 1 có đáp ứng miễn dịch gia tăng tốt nhất trong quá trình gây miễn dịch với hiệu giá kháng thể cao nhất.

Bảng 2. Giá trị ngưỡng (cut- off) với độ tin cậy từ 95% tới 99.9%.

Độ tin cậy (1- α)	Hệ số f với n=11	Giá trị ngưỡng	Tỷ lệ mẫu âm
95	1,893	0,074	10/11 (91%)
97,5	2,327	0,081	11/11 (100%)
99	2,887	0,091	11/11 (100%)
99,5	3,31	0,098	11/11 (100%)
99,9	4,328	0,115	11/11 (100%)

Bảng 3. Kết quả OD_{450nm} theo độ pha loãng của mẫu huyết thanh thử kháng protein SAO.

		OD _{450nm}					
Độ pha loãng		8000	16000	32000	64000	128000	256000
Log2 [độ pha loãng]		10	11	12	13	14	15
Thỏ	Ngày						
1	28	0,127	0,139*	0,082	0,044	0,027	0,029
	56	0,549	0,331	0,23	0,156	0,094*	0,063
	84	0,696	0,412	0,308	0,223	0,104*	0,067
	28	0,07	0,047	0,036	0,017	0,004	0,008
2	56	0,407	0,194	0,103*	0,06	0,031	0,024
	84	0,187	0,113*	0,05	0,029	0,014	0,012
	28	0,121*	0,057	0,027	0,01	0,008	0,002
3	56	0,139*	0,056	0,029	0,013	0,014	0,014

Độ đặc hiệu và độ nhạy của kháng thể đa dòng kháng protein SAO trong phương pháp ELISA kiểu mẫu

Để đánh giá độ đặc hiệu của kháng thể SAO trong phương pháp ELISA phát hiện kháng nguyên SAO-M của *S. suis* trong khảo sát huyết thanh trong cộng đồng. Chúng tôi tiến hành sử dụng các kháng nguyên trong phản ứng đối chứng âm là một số loại vi khuẩn khác *S. suis* và là vi khuẩn thường gặp trong phân lập chẩn đoán từ bệnh nhân bị nhiễm trùng huyết và viêm màng não mủ *S. pyogenes*, *E. coli*, *H. influenza*, *S. aureus*, *N. meningitidis* và *S. pneumonia*.

Thí nghiệm ELISA kiểm tra độ đặc hiệu của kháng thể đa dòng kháng protein SAO được thiết kế với kháng thể sơ cấp là huyết thanh thử đối chứng âm hoặc thử 1 (chích protein SAO-M) được thu nhận tại thời điểm T0 và T3, cùng với kháng nguyên là protein SAO và các kháng nguyên vi khuẩn khác. Kết quả (Hình 5) cho thấy giá trị OD_{450nm} của phản ứng ELISA giữa huyết thanh thử kháng protein SAO và protein SAO có giá trị cao OD_{450nm} khoảng 1. Như vậy, kháng thể kháng protein SAO đã được sản xuất thành công với hàm lượng tương đối cao. Giá trị OD của phản ứng ELISA giữa huyết thanh thử kháng protein SAO với kháng nguyên là protein tổng của chủng vi khuẩn *S. pyogenes* là dưới 0,1; với chủng vi khuẩn *E. coli*, *H. influenza*, *S. aureus*, *N. meningitidis* và *S. pneumonia* cho kết quả OD từ 0,1 đến 0,4. Tuy nhiên, các giá trị OD_{450nm} này tương tự nhau ở huyết thanh thử thu nhận trước quá trình gây miễn dịch thử thời điểm T0 (chứng âm) và sau khi gây miễn dịch thử với protein SAO-M thời điểm T3. Do vậy, chúng tôi giả thiết là trong huyết thanh thử thu nhận có kháng thể kháng những vi khuẩn khác như *E. coli*, *S. aureus*, *H. influenza* và các kháng thể kháng lại những loại vi khuẩn này đã có sẵn trong huyết thanh

của thử trước khi gây miễn dịch. Điều này có thể do thử dùng trong thí nghiệm đã bị nhiễm các kháng nguyên này từ trước khi được gây miễn dịch, từ nơi cung cấp con giống.

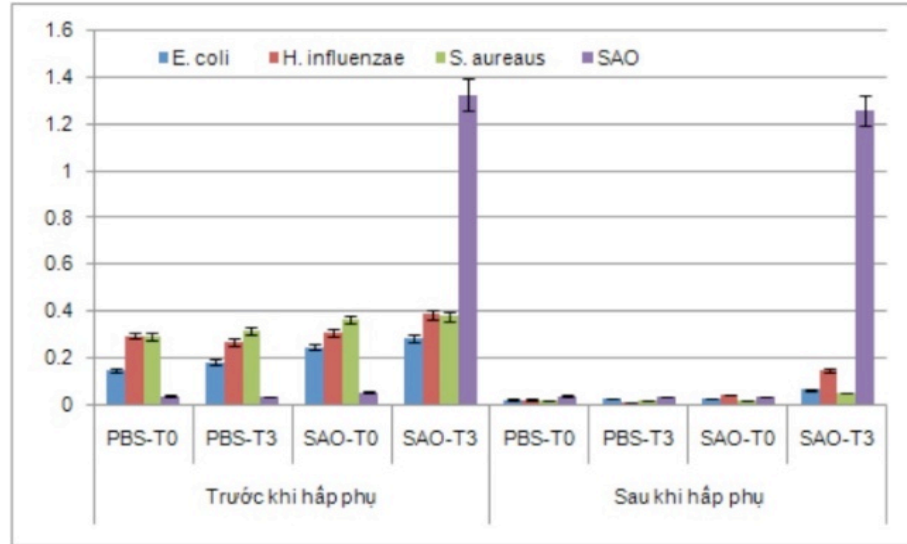
Để khẳng định giả thuyết này, mẫu huyết thanh chứa kháng thể đa dòng kháng protein SAO thu nhận được thực hiện thí nghiệm hấp phụ với protein tổng của các chủng vi khuẩn có giá trị OD cao (*E. coli*, *H. influenza* và *S. aureus*) để loại bỏ các kháng thể kháng với các vi khuẩn đó để kiểm tra độ đặc hiệu của kháng thể kháng SAO-M.

Sau phản ứng hấp phụ giữa mẫu huyết thanh thu nhận từ thử được gây miễn dịch với protein SAO-M với protein tổng của các chủng vi sinh *E. coli*, *H. influenza* và *S. aureus*, giá trị OD_{450nm} của các phản ứng đó đã giảm xuống đáng kể, trong khi đó giá trị OD_{450nm} giữa mẫu huyết thanh với protein SAO-M không có sự thay đổi nào (Hình 6). Vậy huyết thanh thu nhận từ thử có thể chứa nhiều dòng kháng thể khác nhau bao gồm cả kháng thể kháng SAO protein. Như vậy, qui trình sinh miễn dịch đã tạo ra kháng thể đa dòng kháng protein SAO có độ đặc hiệu 100% với SAO protein.

Độ nhạy của kháng thể đa dòng kháng protein SAO được xác định bằng lượng kháng thể tối thiểu cho kết quả ELISA dương tính trong phản ứng với protein SAO phủ giếng. Huyết thanh thử được gây miễn dịch bằng protein SAO thu nhận ở ngày 83 sau khi được kiểm tra độ đặc hiệu, sẽ được pha loãng để thực hiện phản ứng ELISA với protein SAO ở mật độ 1ug/ml (~ 0,1 ug/ giếng). Độ nhạy của kháng thể thay đổi theo từng cá thể thử dùng trong thí nghiệm. Do thử 3 bị chết trước khi thu nhận huyết thanh vào ngày 83 do vậy độ nhạy của huyết thanh thử 3 không được kết luận.

Độ nhạy của huyết thanh thử 1 là rất cao với độ pha loãng 128000 và thử 2 là 16000 sau 84 ngày.

Do vậy, độ nhạy chung cho khảo sát này được xác định là ≥ 16000 (Bảng 3).



Hình 5. Sự thay đổi giá trị OD của phản ứng ELISA khi tiến hành phản ứng hấp phụ.

Đánh giá hiệu lực của thử nghiệm ELISA kiểu mẫu sử dụng huyết thanh bệnh nhân

Để đánh giá hiệu lực của phương pháp ELISA kiểu mẫu (prototype) trong khảo sát huyết thanh học trên người, chúng tôi sử dụng mẫu huyết thanh thu nhận từ bệnh nhân nhiễm *S. suis*, được chẩn đoán xác định bằng nuôi cấy (tiêu chuẩn vàng) và của bệnh nhân không nhiễm *S. suis*, được chẩn đoán xác định dương tính bằng nuôi cấy với các tác nhân gây bệnh vi trùng khác.

Các giá trị ngưỡng trong phản ứng ELISA sử dụng huyết thanh bệnh nhân không nhiễm *S. suis* (chứng âm) được xác định là 0,231, 0,261 và 0,334 với các độ tin cậy lần lượt tương đương 97,5%, 99% và 99,9% (Bảng 4). Độ đặc hiệu của ELISA kiểu mẫu tương đương với độ tin cậy 97,5% và 99% được xác định là 95%. Trong khi

đó, với độ tin cậy 99,9% phương pháp ELISA này có độ đặc hiệu là 100%. Tuy nhiên khi xác định độ nhạy của phương pháp ELISA, sử dụng kết quả ELISA với các mẫu dương tính trong cùng chuỗi phản ứng, tại độ đặc hiệu 95% và 100% ở các độ tin cậy 97,5%, 99% và 99,9% như nêu ở trên, chúng tôi nhận thấy độ nhạy của chúng thay đổi theo chiều giảm dần từ 90%, 85% và 60%. Do vậy, giá trị ngưỡng 0,231 với bước sóng OD_{450nm} tại độ tin cậy 97,5% được chọn là giá trị ngưỡng (cut-off) cho phản ứng ELISA, với độ đặc hiệu 95% và độ nhạy là 90%, dùng trong khảo sát huyết thanh người.

Giá trị ngưỡng được xác định sử dụng công thức $Cut-off = X + SD * f$ (Andreas Frey *et al.*, 1998), trong đó X là tổng số mẫu (20) thu nhận từ bệnh nhân được xác định âm tính với *S. suis*, với giá trị OD trung bình (0,085) và độ lệch chuẩn SD = 0,068.

Bảng 4. Giá trị ngưỡng (cut-off) cho phản ứng ELISA sử dụng mẫu huyết thanh của bệnh nhân âm tính với *S. suis*.

Độ tin cậy (%)	Hệ số f theo cỡ mẫu (n = 20)	Giá trị cut-off	Âm thật		Dương thật	
			n	%	n	%
95	1,772	0,205	19/20	95	1/20	5
97,5	2,145	0,231	19/20	95	1/20	5
99	2,602	0,261	19/20	95	1/20	5
99,5	2,932	0,284	20/20	100	0/20	0
99,9	3,668	0,334	20/20	100	0/20	0

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã thành công trong việc biểu hiện vượt trội, thu nhận protein SAO-M và tạo được kháng thể đặc hiệu của SAO-M trên mô hình thỏ. Các sản phẩm này bước đầu được ứng dụng trong việc phát triển phương pháp ELISA kiểu mẫu (prototype) nhằm tạo nền tảng cho việc đánh giá khả năng sử dụng ELISA với kháng nguyên SAO để khảo sát hiện diện của kháng thể kháng *S. suis*. Kết quả bước đầu khảo sát độ đặc hiệu và độ nhạy của phương pháp ELISA để phát hiện kháng thể *S. suis* trong huyết thanh của bệnh nhân cho thấy phương pháp ELISA có độ nhạy (>95%) và đặc hiệu tương đối tốt (>90%). Tuy nhiên, với hạn chế là cỡ mẫu thử nghiệm (20 cặp) còn giới hạn, qui trình ELISA này cần phải được khảo sát với lượng mẫu lớn hơn để đánh giá khả năng và điều kiện ứng dụng trong thực tế trong tầm soát nhiễm trên người. Ngoài ra phương pháp ELISA kiểu mẫu này có thể được ứng dụng trong tầm soát nhiễm trên heo cũng nên được đánh giá.

Lời cảm ơn: Đề tài nhận hỗ trợ tài chính của Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh (28/2013/HĐ-SKHCN) cho TS. Ngô Thị Hoa và từ tổ chức Welcome Trust, Vương Quốc Anh. Cảm ơn sự hỗ trợ kỹ thuật của chị Lưu Thị Nghĩa thuộc bộ môn Dược lý, khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh trong chăm sóc thỏ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Andreas Frey, Canzio JD, Zurakowski D (1998) A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays.

Chiêu TTB, Hà HN, Nghĩa HĐT, Châu NVV, Hoa NT (2014) Khảo sát tính sinh miễn dịch của protein bề mặt 1 (SAO) của *Streptococcus suis*.

Elbers AR, Vecht U, Osterhaus AD, Groen J, Wisselink HJ, Diepersloot RJ, Tielens MJ (1999) Low prevalence of antibodies against the zoonotic agents *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., *Streptococcus suis* serotype II, hantavirus, and lymphocytic choriomeningitis virus among veterinarians and pig farmers in the southern part of The Netherlands. *Vet Q* 21(2): 50-54.

Gottschalk M, Segura M, Xu J (2007) *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim Health Res Rev* 8(1): 29-45.

Hoa NT, Chieu TT, Do Dung S, Long NT, Hieu TQ, Luc NT, Nhung PT, Huong VT, Trinh DT, Wertheim HF, Van Kinh N, Campbell JI, Farrar J, Chau NV, Baker S,

Bryant JE (2013) *Streptococcus suis* and porcine reproductive and respiratory syndrome, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 19(2): 331-333.

Huong VT, Ha N, Huy NT, Horby P, Nghia HD, Thiem VD, Zhu X, Hoa NT, Hien TT, Zamora J, Schultsz C, Wertheim HF, Hirayama K (2014) Epidemiology, clinical manifestations, and outcomes of *Streptococcus suis* infection in humans. *Emerg Infect Dis* 20(7): 1105-1114.

Li Y, Gottschalk M, Esgleas M, Lacouture S, Dubreuil JD, Willson P, Harel J (2007) Immunization with recombinant Sao protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. *Clin Vaccine Immunol* 14(8): 937-943.

Mai NT, Hoa NT, Nga TV, Linh le D, Chau TT, Sinh DX, Phu NH, Chuong LV, Diep TS, Campbell J, Nghia HD, Minh TN, Chau NV, de Jong MD, Chinh NT, Hien TT, Farrar J, Schultsz C (2008) *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam. *Clin Infect Dis* 46(5): 659-667.

Nghia HD, Tu le TP, Wolbers M, Thai CQ, Hoang NV, Nga TV, Thao le TP, Phu NH, Chau TT, Sinh DX, Diep TS, Hang HT, Truong H, Campbell J, Chau NV, Chinh NT, Dung NV, Hoa NT, Spratt BG, Hien TT, Farrar J, Schultsz C (2011) Risk factors of *Streptococcus suis* infection in Vietnam. A case-control study. *PLoS One* 6(3): e17604.

Robertson ID, Blackmore DK (1989) Occupational exposure to *Streptococcus suis* type 2. *Epidemiol Infect* 103(1): 157-164.

Segura M, Zheng H, Greeff A, Gao GF, Grenier D, Jiang Y, Lu C, Maskell D, Oishi K, Okura M, Osawa R, Schultsz C, Schwerk C, Sekizaki T, Smith H, Srimanote P, Takamatsu D, Tang J, Tenenbaum T, Tharavichitkul P, Hoa NT, Valentin-Weigand P, Wells JM, Wertheim H, Zhu B, Gottschalk M, Xu J (2014) Latest developments on *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen: part 1. *Future Microbiol* 9: 441-444.

Strangmann E, Froleke H, Kohse KP (2002) Septic shock caused by *Streptococcus suis*: case report and investigation of a risk group. *Int J Hyg Environ Health* 205(5): 385-392.

Wangkaew S, Chaiwarith R, Tharavichitkul P, Supparatpinyo K (2006) *Streptococcus suis* infection: a series of 41 cases from Chiang Mai University Hospital. *J Infect* 52(6): 455-460.

Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultsz C (2009a) *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clin Infect Dis* 48(5): 617-625.

Wertheim HF, Nguyen HN, Taylor W, Lien TT, Ngo HT, Nguyen TQ, Nguyen BN, Nguyen HH, Nguyen HM, Nguyen CT, Dao TT, Nguyen TV, Fox A, Farrar J, Schultsz C, Nguyen HD, Nguyen KV, Horby P (2009b) *Streptococcus suis*, an important cause of adult bacterial meningitis in northern Vietnam. *PLoS One* 4(6): e5973.

DEVELOPMENT OF AN ELISA USING THE SURFACE ANTIGEN ONE PROTEIN TO DETECT FOR *STREPTOCOCCUS SUIIS* INFECTION

Tran Thi Bich Chieu¹, Vo Minh Hoa¹, Phan Nha Uyen¹, Tran Manh Hung², Nguyen Van Vinh Chau³, Ngo Thi Hoa¹✉

¹Centre for Tropical Medicine, Oxford University Clinical Research Unit, Ho Chi Minh City

²University of Medicine and Pharmacy, Ho Chi Minh City

³Hospital for Tropical Diseases, Ho Chi Minh City

SUMMARY

Streptococcus suis (*S. suis*) is one of the most important pathogens to cause acute bacterial meningitis in Viet Nam and other Asia countries including Thailand and Hongkong. We investigated the potential of using ELISA with the SAO protein as antigen to detect for *S. suis* specific sero positive. An SAO specific antibody collected from hyperimmunised rabbits was employed to develop the prototype ELISA. *S. suis* and other bacterial pathogens were used to validate the sensitivity and specificity of this method. This prototype ELISA was validated using serum samples collected from meningitis patients to evaluate its application in sero surveillance. The prototype ELISA protocol included a 0.1mg/well concentration of the cloned and purified SAO-M antigen; the primary antibody, anti SAO-M protein, and secondary antibody were used at the dilution of 1:500 and 1:10000, respectively. Rabbit antisera contained specific SAO-M antibody with 100% specificity and titer of >1:16000. Validating the prototype ELISA using serum samples collected from patients infected with *S. suis* and other common pathogens for bacterial meningitis in Vietnam showed the specificity of 95% and sensitivity of 90%. Our current results confirmed the initial success in developing the prototype ELISA in diagnosis for *S. suis* infections and the potential for its future application.

Keywords: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), SAO protein, *Streptococcus suis*, zoonosis

✉ Author for correspondence: E-mail: hoant@oucru.org