

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO KIT PHÁT HIỆN NHANH VI KHUẨN *Streptococcus suis* type 2 GÂY BỆNH Ở LỢN

Lê Quốc Việt^{1*}, Đinh Thị Bích Liên¹, Lê Đức Thọ¹,
Bùi Trần Anh Đào², Phùng Thăng Long³

¹*Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế*

²*Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

³*Viện Công nghệ sinh học, Trường đại học Nông Lâm, Đại học Huế*

Email*: quocviet.vn@gmail.com

Ngày gửi bài: 18.04.2017

Ngày chấp nhận: 12.02.2018

TÓM TẮT

Để chế tạo Kit phát hiện nhanh vi khuẩn *Streptococcus suis* type 2 (*S. suis* 2), $1,5 \times 10^8$ CFU vi khuẩn *S. suis* 2 bất hoạt phối hợp với chất bổ trợ Freund được tiêm cho chuột nhắt trắng Swiss albino để chế tạo kháng thể đa dòng. Kháng thể cộng hợp được chế tạo bằng cách kết hợp kháng thể *S. suis* 2 (360 $\mu\text{g/ml}$) với dung dịch gold colloid (pH 8,0). Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ kháng thể được phủ tại đường kiểm tra thích hợp để bắt vi khuẩn *S. suis* 2 là 2 mg/ml. Kit có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, không phản ứng chéo với các loại vi khuẩn *E. coli* ATCC, *P. aeruginosa* ATCC, *S. aureus* ATCC và các một số chủng *S. suis* không phải type 2. Lượng vi khuẩn *S. suis* 2 tối thiểu Kit có thể phát hiện được là 5×10^5 CFU. Kit sử dụng dễ dàng và có hiệu quả cao trong việc phát hiện *S. suis* type 2.

Từ khóa: Kit chẩn đoán, *Streptococcus suis* type 2, kháng thể cộng hợp, chuột nhắt trắng Swiss albino

Development of Kit for Fast Identification of *Streptococcus suis* type 2 in Pig

ABSTRACT

To develop immunochromatographic strips for direct detection of the *Streptococcus suis* type 2 (*S. suis* 2) antigen, $1,5 \times 10^8$ CFU of inactivated *S. suis* 2 mixed well with Freund's adjuvant was injected to Swiss albino mice to produce polyclonal antibodies. Then, the *S. suis* 2 polyclonal antibody (360 $\mu\text{g/ml}$) was mixed with gold colloid solution (pH 8.0) to create colloidal gold probe. The results indicated that the optimal concentration of capture antibodies in test lane was 2 mg/ml. The Kit had high sensitivity and specificity and no cross-reaction with *E. coli* ATCC, *P. aeruginosa* ATCC, *S. aureus* ATCC or other strains of *S. suis*. The detection sensitivity was found to be as high as 5×10^5 CFU. In conclusion, the Kit is easy for the use and highly efficient for *S. Suis* type 2 detection.

Keywords: Diagnostic kit, *Streptococcus suis* type 2, colloidal gold probe, Swiss albino mice.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh do nhiễm *Streptococcus suis* gặp ở hầu hết các loài động vật máu nóng. Dựa vào đặc điểm của các polysaccharid ở lớp vỏ bọc vi khuẩn, vi khuẩn liên cầu lợn được xác định có 35 type huyết thanh. Trong đó, *S. suis* 2 thường gây bệnh ở người và động vật (Gottschalk *et al.*, 2007). Đường lây truyền vi khuẩn từ lợn sang

người có thể qua vết thương ở da, đường hô hấp, tiếp xúc với máu, dịch tiết ở lợn bệnh hoặc qua đường ăn uống.

Để phát hiện vi khuẩn *S. suis* 2, các nhà nghiên cứu thường sử dụng phương pháp ELISA, PCR, kết tủa trên thạch (Okwumabua *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1999) hoặc là sử dụng các Kit thương mại trên thị trường hiện nay như: sản phẩm Streptococcus suis type 2, PCR Set

(MyBioSource), sản phẩm Immulex™ *streptococcus suis* kit (SSI Diagnostica). Nhưng các phương pháp này có nhược điểm là mất thời gian và cần kỹ thuật viên có kỹ năng phòng thí nghiệm tốt. Trong những năm gần đây, trên thế giới đã phát triển loại Kit chẩn đoán nhanh dựa trên phương pháp sắc ký miễn dịch có độ đặc hiệu, độ chính xác cao, không cần phòng thí nghiệm, không cần thiết bị và kỹ thuật viên có trình độ cao, giúp phát hiện bệnh sớm, điều trị kịp thời, giảm thiểu được thiệt hại cho người chăn nuôi và bệnh súc. Xuất phát từ những yêu cầu thực tế và cơ sở khoa học của việc nghiên cứu, chúng tôi tiến hành nghiên cứu Kit phát hiện nhanh vi khuẩn *S. suis* 2 gây bệnh ở lợn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vi khuẩn *S. suis* 2 do Bộ môn Miễn dịch học và Vaccin, Viện Công nghệ sinh học - Đại học Huế cung cấp (Lê Quốc Việt và cs., 2017).

Chuột nhắt trắng Swiss albino (SA) 10 tuần tuổi, khối lượng 30 - 32 g/con được nuôi trong chuồng nhựa có lớp trấu đã hấp khử trùng, nhiệt độ phòng nuôi duy trì ở 25°C. Chuột được cho uống nước vô trùng và ăn thức ăn tổng hợp AniFood (Viện Vaccin và Sinh phẩm y tế).

Các chất bổ trợ khác nhau dùng trong sản xuất vaccin: Freund's adjuvant (Sigma Aldrich), Montanide ISA 201 VG (Seppic, Pháp), Montanide ISA 50V2 (Seppic, Pháp).

Các hóa chất và vật dụng chế tạo Kit chẩn đoán nhanh: Gold colloid 40nm (DCN, Mỹ), đệm mẫu và đệm hút (whatman), sợi thủy tinh (whatman), màng nitrocellulose (NC).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tạo kháng nguyên

Chủng vi khuẩn *S. suis* 2 thuần được nuôi trong môi trường Todd Hewitt broth (THB) trong 7 giờ, sau đó được thu và tái huyền phù với nước cất vô trùng; cấy lên đĩa thạch máu để đếm khuẩn lạc. Phần vi khuẩn còn lại được bất hoạt trong 1% formaldehyde ở 37°C trong 7

ngày (Ju *et al.*, 2010). Vi khuẩn đã bất hoạt được thu và rửa 3 lần với PBS để loại bỏ formaldehyde.

2.2.2. Tạo kháng thể đặc hiệu kháng *S. suis* 2

Xác định tính sinh miễn dịch của *S. suis* 2 bất hoạt được thực hiện trên 5 chuột với liều tiêm phúc mạc 400 µl hỗn hợp vi khuẩn (1×10^8 CFU) và montanide ISA 50V2/chuột. Nhóm đối chứng (5 chuột) được tiêm 400 µl hỗn hợp PBS và montanide ISA 50V2/chuột. Chuột được tiêm 2 lần cách nhau 14 ngày, lấy máu kiểm tra vào ngày thứ 19 tính từ mũi tiêm lần 1.

Xác định lượng kháng nguyên thích hợp gây tối miễn dịch được thực hiện trên 3 nhóm chuột SA (4 con/nhóm) được tiêm phúc mạc 400 µl hỗn hợp kháng nguyên và chất bổ trợ montanide ISA 50V2. Hàm lượng kháng nguyên tương ứng cho 3 nhóm là 2×10^8 CFU/chuột; $1,5 \times 10^8$ CFU/chuột và 1×10^8 CFU/chuột.

Xác định chất bổ trợ thích hợp được thực hiện trên ba nhóm chuột SA (4 con/nhóm) với liều kháng nguyên được xác định căn cứ vào kết quả của thí nghiệm trên và chất bổ trợ. Các chất bổ trợ Freund's adjuvant được sử dụng cho nhóm 1 (Freund's adjuvant, complete vào lần 1; Freund's adjuvant, incomplete vào lần 2 và 3), chất bổ trợ Montanide ISA 201 VG cho nhóm 2 và Montanide ISA 50V2 cho nhóm 3.

Sau lần tiêm đầu tiên, tiến hành lấy 100 µl máu từ tĩnh mạch đuôi chuột (1 lần/tuần) để kiểm tra lượng kháng thể kháng *S. suis* type 2 bằng phương pháp ELISA gián tiếp. Máu sau khi lấy được ly tâm 3.500 vòng/phút trong 10 phút để thu lấy huyết thanh. Bảo quản huyết thanh chuột ở -30°C.

2.2.3. Phương pháp ELISA gián tiếp

Phủ đĩa với 100 µl hỗn hợp kháng nguyên vi khuẩn *S. suis* 2 bất hoạt đã được pha loãng với dung dịch carbonate-bicarbonate buffer (Sigma) với nồng độ $2,5 \times 10^7$ vi khuẩn/ml. Ủ đĩa qua đêm ở 4°C và rửa khay 3 lần với dung dịch PBS-Tween 20 (0,5% Tween). Tiếp tục block đĩa với 200 µl dung dịch 1% BSA và ủ qua đêm tại 4°C. Rửa đĩa 3 lần với PBS-Tween 20. Cho 100 µl

huyết thanh chuột đã được pha loãng 100 lần trong dung dịch 1% BSA vào đĩa, ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa đĩa 5 lần với PBS-Tween 20. Tiếp tục cho 100 µl anti-mouse IgG HRP (Sigma) vào mỗi giếng và ủ 1 giờ tại nhiệt độ phòng. Rửa đĩa 5 lần với PBS-Tween 20. Nhỏ 100 µl cơ chất OPD vào mỗi đĩa và ủ trong tối 15 phút. Thêm 50 µl dung dịch ngừng phản ứng (3M H₂SO₄) vào mỗi giếng. Đọc kết quả bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 492 nm theo đề nghị của nhà sản xuất cơ chất OPD.

Mẫu dương tính khi giá trị OD > giá trị giới hạn (Cut off). Giá trị giới hạn = trung bình OD của nhóm đối chứng + (3x Sai số chuẩn của nhóm đối chứng) (Classen *et al.*, 1987).

2.2.4. Chế tạo Kit phát hiện nhanh vi khuẩn *S. suis* type 2

Kháng thể kháng *S. suis* 2 trong huyết thanh chuột được tinh sạch bằng Econo-Pac protein A Kit (Bio-Rad) và định lượng bằng Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

pH của dung dịch Gold colloid thích hợp để gắn kháng thể với hạt vàng nano được xác định bằng cách trộn 250 µl dung dịch Gold Colloid (pH từ 6,5 - 8,5) với 25 µl dung dịch kháng thể kháng *S. suis* type 2 (C = 500 µg/ml), lắc nhẹ trong 30 phút, sau đó thêm 250 µl dung dịch NaCl 10%. Ủ 10 phút và quan sát. pH thích hợp để gắn là pH mà ở đó hỗn hợp dung dịch trên vẫn giữ được màu hồng tươi. Màu hồng tươi được phát hiện ở bước sóng 520 nm (Paek *et al.*, 2000).

Nồng độ kháng thể kháng *S. suis* 2 tối ưu để gắn với hạt vàng nano vàng trong dung dịch được xác định bằng cách trộn 250 µl dung dịch Gold colloid với 25 µl dung dịch kháng thể kháng *S. suis* type 2 (0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 µg/ml) lắc nhẹ trong 30 phút, sau đó thêm 250 µl dung dịch NaCl 10%. Ủ 10 phút và quan sát ống có nồng độ thấp nhất không bị đổi từ màu hồng sang màu xanh (đo ở bước sóng 520 nm). Nồng độ protein của ống đó chính là nồng độ protein tối thiểu cần để gắn với gold colloid.

Kháng thể cộng hợp được chế tạo bằng cách ủ kháng thể kháng *S. suis* 2, với Gold colloid

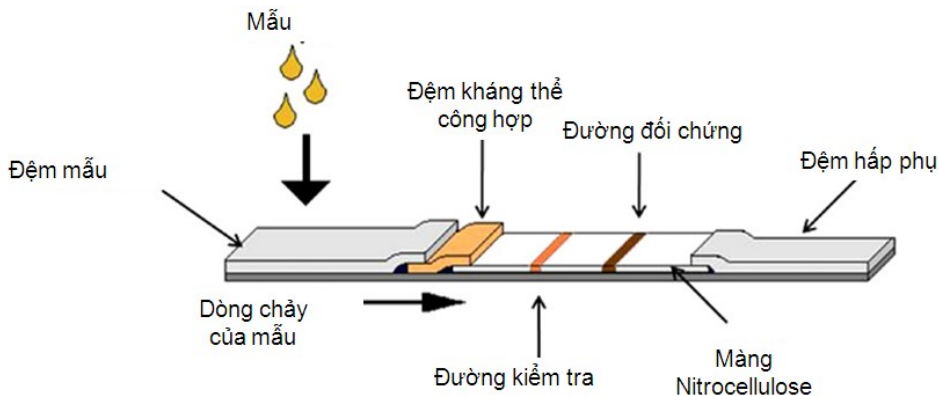
(DCN, 40 nm, Mỹ) với tỷ lệ (1:10, vol/vol) ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó thêm 10% albumin huyết thanh bò (BSA) để cố định các phân tử đã gắn kết. Ly tâm 12.000 vòng trong 30 phút ở 4°C, bỏ dịch nổi. Phần cặn được rửa bằng hỗn hợp 10mM Tris-HCl (pH 8,2) chứa 1% BSA, 5% sucrose. Sau khi ly tâm bỏ dịch nổi, kháng thể cộng hợp được pha loãng trong 100 µl hỗn hợp rửa (Chaudhuri *et al.*, 2001). Cuối cùng kháng thể cộng hợp được cho lên giấy thủy tinh sợi (glass fiber), phơi khô ở nhiệt độ phòng qua đêm.

Xác định nồng độ kháng thể chuột kháng *S. suis* 2 (kháng thể bất) thích hợp bằng cách phun lên màng nitrocellulose (NC) ở đường kiểm tra với các nồng độ khác nhau (1,5; 1,75; 2,0 mg/ml), đồng thời phun Anti-Mouse IgG antibody produced in goat (Sigma-Aldrich, 1 µg/cm) lên màng NC ở đường đối chứng bằng máy Biodot XYZ3060D0003. Sấy khô màng NC ở 50°C trong 1 giờ, sau đó ngâm màng NC trong dung dịch 50 mM đệm axit boric (pH 8,5) chứa 0,5% casein trong 30 phút. Màng NC được rửa bằng dung dịch 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) chứa 0,5% sucrose và 0,05% sodium cholate. Phơi khô màng NC ở nhiệt độ phòng qua đêm (Huang *et al.*, 2004).

Lắp ráp các thành phần để tạo Kit phát hiện nhanh vi khuẩn: màng NC (đã được gắn kháng thể chuột kháng kháng nguyên *S. suis* type 2 và kháng thể dê kháng kháng thể chuột), đệm hấp phụ, đệm kháng thể cộng hợp và đệm mẫu được gắn vào các vị trí tương thích và cắt thành từng thanh có chiều rộng 4 mm.

Kiểm tra hoạt động của Kit bằng cách nhỏ lên đệm mẫu của Kit 100 µl dung dịch nuôi vi khuẩn *S. suis* 2, sau đó cho thêm 100 µl nước cất vô trùng. Quan sát sự xuất hiện của các băng trên màng NC trong 5 - 10 phút. Tất cả thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Kiểm tra tính đặc hiệu của Kit bằng các chủng vi khuẩn khác: *E. coli* ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* ACTT, *Staphylococcus aureus* ATCC (Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế) và một số chủng vi khuẩn *S. suis* không phải là type 2 (Bùi Thị Hiền và cs., 2016).



2.2.5. Phân tích số liệu

Số liệu thu thập được tính toán với phần mềm Excel 2003. Sai khác có ý nghĩa (với $\alpha = 0,05$) được xác định bằng T-test.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả chế tạo kháng thể đặc hiệu kháng *S. suis* 2

3.1.1. Xác định tính sinh miễn dịch của kháng nguyên

Tính sinh miễn dịch của vi khuẩn *S. suis* 2 bất hoạt được xác định bằng phương pháp tiêm hỗn hợp vi khuẩn và chất bổ trợ vào phúc mạc chuột SA. Sau khi được tiêm kháng nguyên và chất bổ trợ 19 ngày tính từ mũi tiêm lần 1, chuột được lấy máu để kiểm tra sự xuất hiện kháng thể

kháng *S. suis* 2. Hiệu giá kháng thể của chuột sau khi tiêm vaccin được trình bày ở bảng 1.

Theo del Campo Sepúlveda *et al.* (1996), việc sử dụng kháng nguyên toàn phân của vi khuẩn *S. suis* 2 gần bản để xây dựng Kit Elisa cho độ đặc hiệu thấp. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này cho thấy giá trị OD₄₉₂ ở nhóm được tiêm kháng nguyên cao hơn rất nhiều lần so với giá trị tới hạn (Cut off = 0,180) (Bảng 1), trong khi các mẫu huyết thanh của nhóm đối chứng có giá trị OD₄₉₂ rất thấp. Theo Ju *et al.* (2010), việc bất hoạt vi khuẩn trong 1% formaldehyde trong 7 ngày ở 37°C đã giúp duy trì gốc đường hoặc các yếu tố quyết định kháng nguyên của vi khuẩn nên kháng nguyên này có tính đặc hiệu cao. Do vậy, trong nghiên cứu này kháng nguyên toàn phân đã được dùng để xây dựng Kit Elisa phát hiện kháng thể kháng *S. suis* 2.

Bảng 1. Hiệu giá kháng thể của chuột sau tiêm vaccin

	Chuột thí nghiệm	Giá trị OD	Mean ± SD
Nhóm được tiêm kháng nguyên	1	2,321	2,391 ± 0,087
	2	2,333	
	3	2,256	
	4	2,455	
	5	2,232	
Nhóm đối chứng	6	0,135	0,138 ± 0,014
	7	0,159	
	8	0,143	
	9	0,122	
	10	0,132	

Giá trị Cut off : 0,180

Lượng vi khuẩn *S. suis* type 2 bất hoạt được sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch khác nhau tùy thuộc vào từng loại động vật thí nghiệm. Theo Ju *et al.* (2010), lượng vi khuẩn *S. suis* 2 được sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch cho thỏ New Zealand là 8×10^9 CFU/thỏ, còn theo Jin *et al.* (2006), lượng vi khuẩn *S. suis* 2 bất hoạt để gây đáp ứng miễn dịch cho lợn là từ $2-3 \times 10^8$ CFU/lợn.

Trong quá trình nghiên cứu, chuột ở nhóm thí nghiệm được theo dõi đều an toàn, không có biểu hiện bất thường. Do vậy có thể khẳng định tính an toàn và khả năng sinh đáp ứng miễn dịch cao của kháng nguyên *S. suis* type 2 trong nghiên cứu này.

3.1.2. Kết quả xác định lượng kháng nguyên thích hợp cho khả năng đáp ứng miễn dịch ở chuột SA

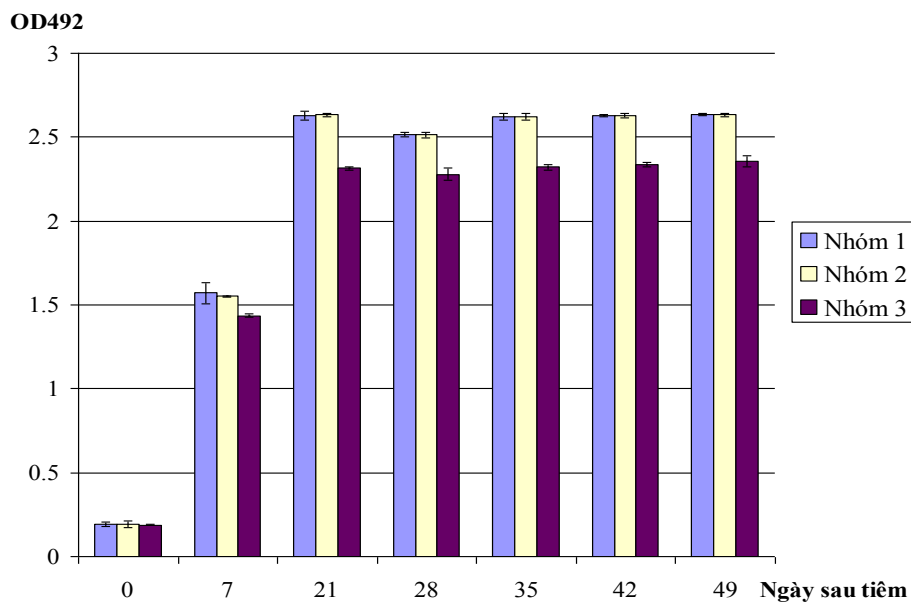
Chuột được lấy máu để xác định hàm lượng kháng thể 1 lần/tuần sau khi tiêm kháng nguyên. Kết quả đánh giá mối quan hệ giữa liều lượng kháng nguyên và hàm lượng kháng thể qua giá trị OD₄₉₂ được trình bày ở hình 1.

Kết quả (Hình 1) cho thấy hàm lượng kháng thể của nhóm 1 và 2 cao hơn nhiều so với hàm lượng kháng thể ở nhóm 3. Giá trị OD₄₉₂ trung bình qua 49 ngày theo dõi ở nhóm

được tiêm kháng nguyên với hàm lượng 2×10^8 CFU/ chuột là 2,113; ở nhóm 2 là 2,111 và nhóm 3 là 1,890.

Kháng thể xuất hiện ngay trong lần tiêm đầu tiên, sau đó tăng cao vào lần tiêm thứ 2. Sau tiêm 28 ngày, hàm lượng kháng thể giảm so với tuần đầu sau tiêm lần 2, do vậy chuột được gây miễn dịch lần 3 là phù hợp. Vào các ngày thứ 35; 42 và 49, hàm lượng kháng thể tăng cao lại và duy trì ổn định. Sự biến thiên hàm lượng kháng thể ở chuột nhất trắng SA được tiêm kháng nguyên *S. suis* type 2 bất hoạt cũng tương tự như sự biến thiên kháng thể ở chuột nhất trắng SA khi được tiêm kháng nguyên tái tổ hợp CagA của vi khuẩn *Helicobacter pylori* (Diệp Thế Tài và cs., 2014) và chuột Balb/C được tiêm kháng nguyên tiêm mao H7 của vi khuẩn *E. coli* (Phạm Thị Tâm và cs., 2011).

Hàm lượng kháng thể của nhóm 1 và 2 cao hơn của nhóm 3 ($|t| > t_{\alpha/2}$). Tuy nhiên, không có sự sai khác giữa hàm lượng kháng thể của nhóm 1 và 2 ($P < 0,05$). Như vậy, hàm lượng kháng nguyên thích hợp được để gây miễn dịch cho chuột nhất trắng là $1,5 \times 10^8$ CFU/chuột. Sự ảnh hưởng của nồng độ kháng nguyên lên đáp ứng miễn dịch của chuột nhất trắng SA cũng được Diệp Thế Tài và cs. (2014) ghi nhận khi tiêm kháng nguyên CagA cho chuột.



Hình 1. So sánh đáp ứng miễn dịch của chuột được tiêm kháng nguyên *S. suis* type 2 với các liều lượng khác nhau

3.1.3. Xác định chất bổ trợ thích hợp cho khả năng đáp ứng miễn dịch ở chuột SA

Theo Robinson *et al.* (1994), đáp ứng miễn dịch của động vật không chỉ phụ thuộc vào loại kháng nguyên mà còn phụ thuộc nhiều vào các yếu tố như: đường tiêm, hàm lượng kháng nguyên và chất bổ trợ. Khi nghiên cứu vai trò của chất bổ trợ đến khả năng đáp ứng miễn dịch của chuột Balb/C đối với kháng nguyên H7 của vi khuẩn *E. coli*, Phạm Thị Tâm và cs. (2011) đã xác định Freund's và Montanide ISA 70 cho kết quả tốt tương tự nhau. Trong một nghiên cứu của Klimka *et al.* (2015) nhằm xác định chất bổ trợ thích hợp cho vacxin phòng chống vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, tác giả cho rằng việc chất bổ trợ Montanide ISA 71 VG cho tác dụng tốt hơn chất bổ trợ Freund's. Trong thí nghiệm này, 3 chất bổ trợ được sử dụng cho 3 lô thí nghiệm là Freund (hoàn toàn và không hoàn toàn), Montanide ISA 201 VG và Montanide ISA 50V2. Kết quả xác định khả năng đáp ứng miễn dịch của chuột sau khi được tiêm kháng nguyên với các chất bổ trợ khác nhau được trình bày trong hình 2.

Hàm lượng kháng thể trong 7 ngày đầu sau khi gây đáp ứng miễn dịch lần 1 của các nhóm chuột không có sự sai khác (Hình 2). Tuy nhiên, sau lần tiêm thứ 2, hàm lượng kháng thể của

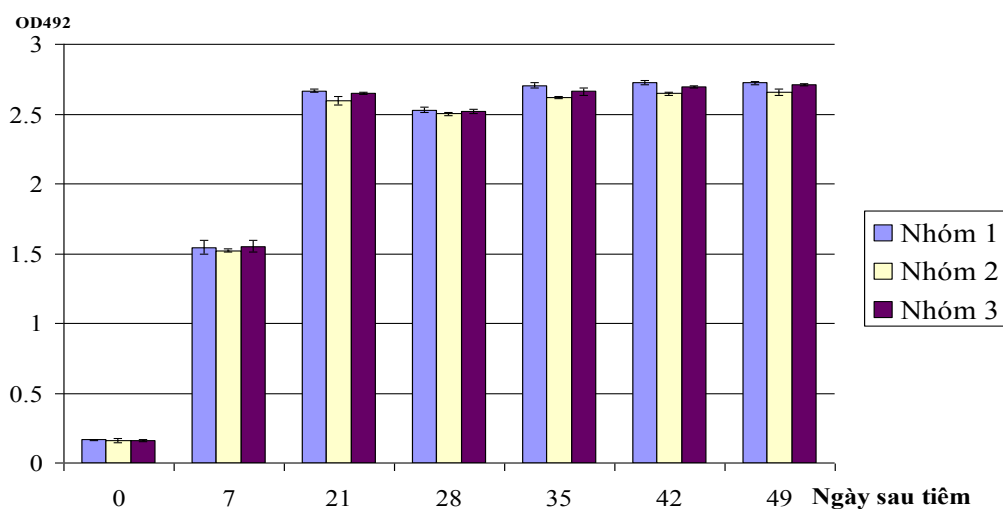
chuột ở các nhóm bắt đầu thay đổi. Vào ngày thứ 21, hàm lượng kháng thể ở nhóm 1 đạt cao nhất (2,665) và thấp nhất ở nhóm 2 (2,596).

Có sự sai khác hàm lượng kháng thể ở 3 nhóm chuột ($P < 0,05$), trong đó nhóm 1 sử dụng chất bổ trợ Freund's cho đáp ứng miễn dịch tốt nhất, giá trị OD492 trung bình của cả giai đoạn thí nghiệm là 2,151. Ở nhóm 3, giá trị OD492 đạt 2,136. Nhóm chuột 2 có hàm lượng kháng thể thấp nhất (OD492 = 2,101). Do vậy, trong thí nghiệm xác định chất bổ trợ thích hợp cho quá trình đáp ứng miễn dịch của chuột nhất trắng, Freund's được lựa chọn làm chất bổ trợ thích hợp, làm tăng khả năng đáp ứng miễn dịch của chuột với kháng nguyên *S. suis* 2 bất hoạt.

3.2. Kết quả chế tạo Kit phát hiện nhanh vi khuẩn *S. suis* 2

3.2.1. pH của dung dịch gold colloid và nồng độ kháng thể tối thiểu thích hợp

Trong nghiên cứu chế tạo Kit chẩn đoán nhanh, việc xác định pH của dung dịch gold colloid và nồng độ protein tối thiểu thích hợp cho sự gắn kết giữa hạt nano vàng trong dung dịch gold colloid và protein là điều quan trọng. Mỗi loại protein khác nhau có nồng độ tối thiểu khác nhau và yêu cầu pH của dung dịch gold

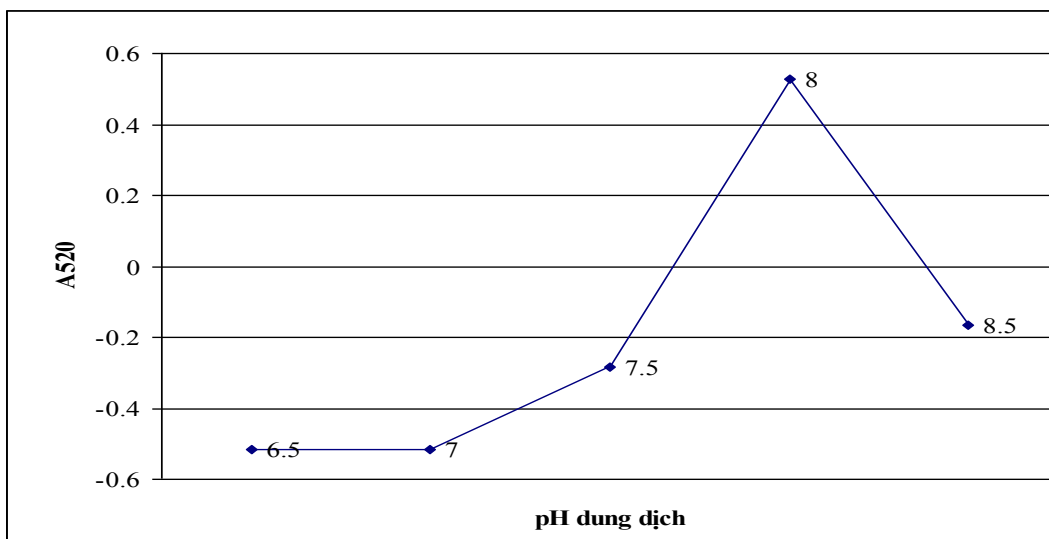


Hình 2. Đáp ứng miễn dịch của chuột được tiêm kháng nguyên *S. suis* type 2 phối trộn với các chất bổ trợ khác nhau

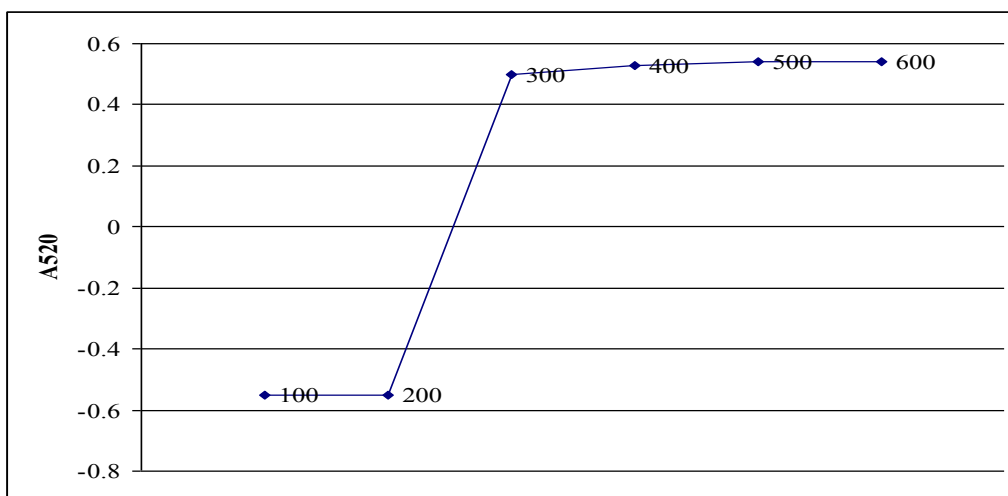
colloid khác nhau. Trong nghiên cứu của Ju *et al.* (2010), khi gắn kháng thể chống kháng nguyên *S. suis* type 2, tác giả đã xác định pH thích hợp của dung dịch gold colloid để gắn là 8,5. pH dung dịch gold colloid 8,5 cũng được sử dụng trong nghiên cứu chế tạo kit phát hiện nhanh độc tố aflatoxin B1 trong mẫu thức ăn của Shim *et al.* (2007). Kết quả nghiên cứu của Đinh Thị Bích Liên và cs. (2015) trên kháng thể chuột kháng kháng nguyên F4 của vi khuẩn *E. coli* cũng đã cho thấy pH gold colloid thích hợp để gắn là 6,5. Trong nghiên cứu này kháng thể chuột kháng *S.suis* type 2 được sử dụng để gắn

với hạt nano vàng trong dung dịch gold colloid. Kết quả xác định pH của dung dịch gold colloid và nồng độ kháng thể tối thiểu thích hợp để gắn kết được trình bày trong hình 3 và 4.

Kết quả ở hình 3 cho thấy ở pH 6,5 và 7,0, dung dịch có màu tím nhạt, kiểm tra ở bước sóng A520 thì thấy giá trị < 0. Ở pH 7,5; 8,0 và 8,5 dung dịch trong ống eppendorf có màu hồng tươi, kiểm tra ở bước sóng A520 thì chỉ có ở pH 8,0 cho giá trị > 0. Do vậy, pH 8,0 là pH thích hợp nhất của dung dịch gold colloid để gắn kháng thể vào hạt nano vàng.



Hình 3. Kết quả xác định pH dung dịch gold colloid thích hợp



Hình 4. Kết quả xác định nồng độ kháng thể thích hợp để gắn với dung dịch gold colloid

Quan sát màu ở các ống thí nghiệm cho thấy ở nồng độ kháng thể kháng *S. suis* 2 là 100 và 200 $\mu\text{g/ml}$, dung dịch trong ống có màu tím hồng, đo ở bước sóng 520 có giá trị < 0 . Ở nồng độ kháng thể *S. suis* 2 là 300, 400, 500 và 600 $\mu\text{g/ml}$, dung dịch trong ống có màu hồng đỏ, kiểm tra ở bước sóng 520 cho kết quả > 0 . Vậy với thí nghiệm này, nồng độ tối thiểu thích hợp được xác định để gắn kháng thể kháng *S. suis* type 2 với hạt nano vàng là 300 $\mu\text{g/ml}$. Theo đề nghị của Ju *et al.* (2010), lượng kháng thể được sử dụng để gắn với hạt nano vàng trong dung dịch gold colloid nên chọn ở tỷ lệ 120% lượng kháng thể xác định được. Do vậy trong các thí nghiệm tiếp theo, lượng kháng thể *S. suis* type 2 để gắn được sử dụng là 360 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.2. Nồng độ kháng thể bất vi khuẩn thích hợp

Để kiểm tra nồng độ kháng thể thích hợp bất vi khuẩn, 100 μl dung dịch chứa 5×10^7 vi khuẩn *S. suis* type 2 được đưa vào đệm mẫu của các que thử được phủ kháng thể kháng *S. suis* 2 với các nồng độ khác nhau.

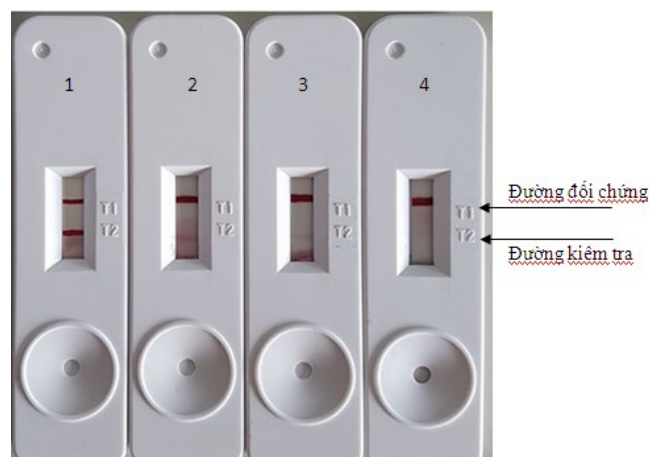
Kết quả xác định nồng độ kháng thể bất thích hợp cho việc sản xuất Kit chẩn đoán được thể hiện ở hình 5. Sau thời gian từ 5 - 10 phút, ở nồng độ 1.500 $\mu\text{g/ml}$, đường kiểm tra được quan sát thấy xuất hiện rất mờ, trong khi ở nồng độ

1.750 $\mu\text{g/ml}$ có thể quan sát được 2 đường rõ ràng, tuy nhiên đường kiểm tra xuất hiện không rõ như ở nồng độ kháng thể bất 2.000 $\mu\text{g/ml}$. Do vậy, nồng độ thích hợp nhất để bất vi khuẩn *S. suis* type 2 đã được xác định là 2.000 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.3. Độ nhạy và độ đặc hiệu của Kit

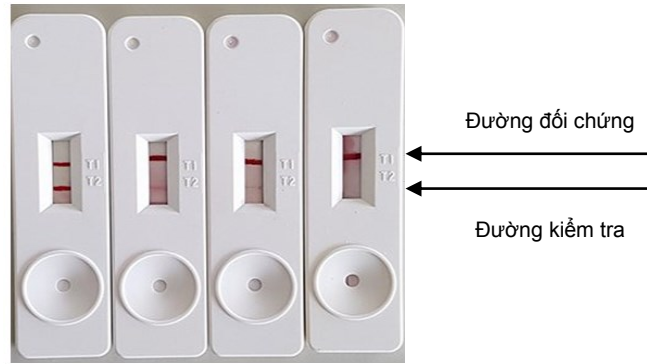
Để phát hiện độ nhạy của Kit, dung dịch nuôi chứa 5×10^8 CFU/ml *S. suis* 2 được pha loãng thành các nồng độ khác nhau với môi trường THB vô trùng. Cho 100 μl dung dịch vi khuẩn từ các ống đã pha loãng cho vào Kit, tiếp theo cho 100 μl nước cất vô trùng để làm sạch màng NC. Kết quả cho thấy (Hình 6) ở Kit số 1 và số 2 xuất hiện 2 đường rõ rệt, trong khi ở Kit số 3, đường kiểm tra xuất hiện một mờ nhưng có thể quan sát được. Ở Kit số 4, chỉ thấy xuất hiện màu ở đường đối chứng. Kết quả này xác định nồng độ vi khuẩn tối thiểu trong mẫu Kit có thể phát hiện là 5×10^6 CFU/ml (5×10^5 CFU trong 100 μl mẫu).

Vi khuẩn *S. suis* 2 *E. coli* ATCC, *P. aeruginosa* ACTT, *S. aureus* ATCC và các chủng *S. suis* không phải type 2 được nuôi trong môi trường THB ở 37°C được thu thập để kiểm tra độ đặc hiệu của Kit. Kết quả (Hình 7) cho thấy, chỉ có vi khuẩn *S. suis* 2 cho kết quả dương tính với Kit chẩn đoán, còn với các loại vi khuẩn khác đều cho kết quả âm tính.



Hình 5. Kết quả xác định nồng độ kháng thể bất thích hợp

Ghi chú: 1: Nồng độ 2.000 $\mu\text{g/ml}$; 2: nồng độ 1.750 $\mu\text{g/ml}$; 3: nồng độ 1.500 $\mu\text{g/ml}$; 4: blank



Hình 6. Kết quả xác định độ nhạy của Kit

Ghi chú: 1: *S. suis* 2.5×10^8 CFU/ml, 2: *S. suis* 2.5×10^7 CFU/ml, 3: *S. suis* 2.5×10^6 CFU/ml, 4: *S. suis* 2.5×10^5 CFU/ml



Hình 7. Kết quả xác định độ đặc hiệu của Kit

Ghi chú: 1: *S. suis* 2, 2: *E. coli* ATCC, 3: *P. aeruginosa* ACTT, 4: *S. aureus* ATCC; 5, 6, 7. *S. suis* (không phải type 2)

Kết quả này thể hiện độ nhạy và độ đặc hiệu cao của Kit phát hiện nhanh vi khuẩn *S. suis* type 2. Với phương pháp này, Ju *et al.* (2010) đã sản xuất kháng thể đa dòng từ kháng nguyên *S. suis* 2 được bất hoạt bởi 1% Formol trong 7 ngày và đã chứng minh kháng thể sinh ra chỉ phản ứng dương tính với vi khuẩn *S. suis* 2 và không kết hợp với các chủng vi khuẩn liên cầu từ type 1 đến 15 ngoại trừ *S. suis* do 2 chủng này chia sẻ gốc đường hoặc các yếu tố quyết định kháng nguyên.

4. KẾT LUẬN

Kháng nguyên *S. suis* type 2 được bất hoạt bằng formol 1% có độ an toàn và tính sinh miễn dịch cao đối với chuột nhắt trắng SA.

Lượng kháng nguyên thích hợp cho quá trình gây đáp ứng miễn dịch ở chuột nhắt trắng

SA là $1,5 \times 10^7$ CFU/chuột.

Chất bổ trợ thích hợp cho sự đáp ứng miễn dịch của chuột SA với kháng nguyên *S. suis* type 2 bất hoạt là Freund. Chất bổ trợ Freund hoàn toàn cho lần gây đáp ứng miễn dịch thứ 1 và chất bổ trợ Freund không hoàn toàn cho lần gây đáp ứng miễn dịch thứ 2 và 3.

Nồng độ tối thiểu của kháng thể thích hợp cho phản ứng kết hợp với dung dịch gold colloid pH 8,0 là 360 $\mu\text{g/ml}$. Nồng độ kháng thể bất kháng nguyên thích hợp để phủ lên màng NC là 2.000 $\mu\text{g/ml}$.

Kit phát hiện nhanh vi khuẩn *S. suis* 2 có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, không có phản ứng chéo với các loại vi khuẩn khác và các chủng *S. suis* khác. Lượng vi khuẩn tối thiểu Kit có thể phát hiện được là 5×10^5 CFU.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đinh Thị Bích Lân (2015). Nghiên cứu tạo kháng nguyên bám dính tái tổ hợp để sản xuất kit chẩn đoán và vaccin phòng bệnh do *E. coli* gây ra ở lợn. Báo cáo tổng hợp đề tài độc lập cấp Nhà nước, trang 74-77.
- Diệp Thế Tài, Đỗ Hồng Phước, Lê Thị Tuyết Nga, Nguyễn Thị Phương Lan, Trần Ánh Tuyết (2014). Nghiên cứu tạo kháng thể đa dòng và bước đầu ứng dụng phát hiện *Helicobacter pylori* trong mẫu huyết thanh và nước bọt. Tạp chí Sinh học, 36(1se): 42-46.
- Phạm Thị Tâm, Phạm Công Hoạt, Tô Long Thành (2011). Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch của chuột Balb/C với kháng nguyên lông roi của vi khuẩn *E.coli* O157:H7. Tạp chí Khoa học Kỹ Thuật Thú y, 8(3): 50-55. ISSN 0868-2933.
- Chaudhuri, B., Raychaudhuri, S. (2001). Manufacturing high quality goldsol. IVD Technol., 8: 46-54.
- Classen D. C., J. M. Morningstar, J. D. Shanley (1987). Detection of antibody to murine cytomegalovirus by enzyme-linked immunosorbent and indirect immunofluorescence assays. J Clin Microbiol., 25(4): 600-4.
- del Campo Sepúlveda EM, Altman E, Kobisch M, D'Allaire S, Gottschalk M. (1996). Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. Vet Microbiol., 52(1-2): 113-25.
- Gottschalk M., M. Segura, J. Xu (2007). *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. Anim. Health Res. Rev., 8: 29-45.
- Bùi Thị Hiền, Hồ Lê Quỳnh Châu, Hồ Trung Thông, Võ Thị Minh Tâm. Sự lưu hành của liên cầu khuẩn lợn (*Streptococcus suis*) trên một số địa bàn thuộc tỉnh Thừa Thiên - Huế trong vụ xuân - hè năm 2015, Tạp chí Khoa học Kỹ Thuật Thú y (Hội Thú y Việt Nam), 23(2): 12-17.
- Huang X., Xuan X., Hirata H., Yokoyama N., Xu L., Suzuki N., Igarashi I. (2004). Rapid Immunochromatographic Test Using Recombinant SAG2 for Detection of Antibodies against *Toxoplasma gondii* in Cats. Journal of Clinical Microbiology, pp. 351-353.
- Ju Y, Hao HJ, Xiong GH, Geng HR, Zheng YL, Wang J, Cao Y, Yang YH, Cai XH, Jiang YQ, Ying Ju, Huai-Jie Hao, Guo-Hua Xiong, Hong-Ran Geng, Yu-Ling Zheng, Jing Wang, Yuanyin Cao, Yin-Hui Yang, Xue-Hui Cai, Yong-Qiang Jiang (2010). Development of colloidal gold-based immunochromatographic assay for rapid detection of *Streptococcus suis* serotype 2. Veterinary Immunology and Immunopathology, 133: 207-211.
- Klimka A., Michels L., Glowalla E., Tosetti B., Krönke M., Krut O. Montanide ISA 71 VG is Advantageous to Freund's Adjuvant in Immunization Against *S. aureus* Infection of Mice. Scand J Immunol., 81(5): 291-7
- Okwumabua O., M. O'Connor, E. Shull (2003). A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. FEMS Microbiol. Lett., 218(1): 79-84
- Paek SH, Lee SH, Cho JH, Kim YS. (2000). Development of Rapid One-Step Immunochromatographic Assay. METHODS, 22: 53-60. doi:10.1006/meth.2000.1036, available online at <http://www.idealibrary.com> on.
- Robinson K., T. Bellaby, D. Wakelin (1994). Vaccination against the nematode *Trichinella spiralis* in high- and low-responder mice. Effects of different adjuvants upon protective immunity and immune responsiveness. Immunology, 82: 261-26.
- Shim W. B., Yang Z. Y., Kim J. S., Kim J. Y., Kang S. J., Woo G. J., Chung Y. C., Eremin S. A., Chung D. H. (2007). Development of immunochromatography strip-test using nanocolloidal gold-antibody probe for the rapid detection of aflatoxin B1 in grain and feed samples. J Microbiol Biotechnol., 17(10): 1629-37.
- Smith H. E., Vincent Veenbergen, Joeke van der Velde, Marloes Damman, Henk J. Wisselink, and Mari A. Smits (1999). The cps genes of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 9: development of rapid serotype-specific PCR assays. J. Clin. Microbiol., 37(10): 3146-3152.
- Lê Quốc Việt, Hoàng Thị Thùy Nhung, Đinh Thị Bích Lân, Đặng Thanh Long, Huỳnh Văn Chương, Lê Công Thịnh, Phùng Thăng Long, Nguyễn Xuân Hòa (2017). Xác định tỷ lệ nhiễm *Streptococcus suis* type 2 ở lợn giết mổ trên địa bàn thành phố Huế và tạo dòng, biểu hiện gene mã hóa 6-phosphogluconate-dehydrogenase protein trong *E. coli* BL21, Tạp chí Khoa học Kỹ Thuật Thú y (Hội Thú y VN), 24(2): 31-40.