

CÁC PHƯƠNG PHÁP CHUẨN ĐOÁN THƯƠNG HÀN THÔNG DỤNG

VÕ THỊ HOÀNG MI (*)

BBT: Đây là một trong 18 đề tài được vào chung kết giải thưởng khoa học sinh viên Euréka lần VII năm 2005 của sinh viên Võ Thị Hoàng Mi, khóa 2001-2005, Khoa Công nghệ sinh học-Đại học Mở Bán công TP.HCM.

I. MỤC ĐÍCH NGHIÊN CỨU:

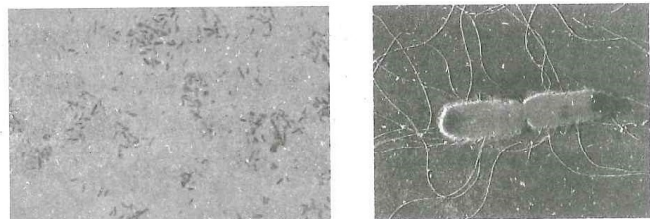
Bệnh thương hàn cho đến ngày nay vẫn là một trong những bệnh phổ biến trên thế giới. Ở Việt Nam, bệnh thương hàn hiện diện ở hầu hết các tỉnh thành trong cả nước nhưng lưu hành chủ yếu là vùng đồng bằng sông Cửu Long.

Do đó, việc phát hiện sớm tác nhân gây bệnh và điều trị kịp thời không những làm giảm nguy cơ biến chứng, tỷ lệ tử vong của bệnh thương hàn mà còn góp phần hữu hiệu nhằm ngăn chặn việc phát sinh và lan tràn của các dòng vi khuẩn kháng kháng sinh.

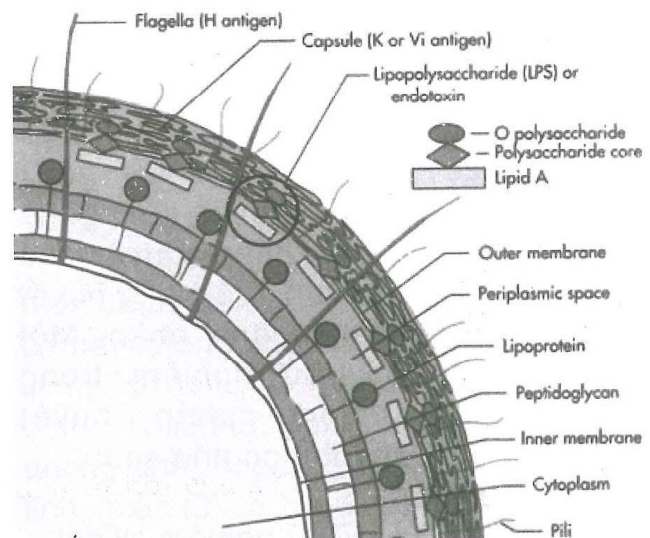
Mục tiêu của đề tài là nhằm thiết lập kỹ thuật ELISA phát hiện kháng thể IgM đặc hiệu với *S. typhi*. Từ đó góp phần trong việc nghiên cứu chế tạo và sản xuất bộ kits chẩn đoán thương hàn dựa trên thử nghiệm ELISA với giá thành thấp, chất lượng cao nhằm đáp ứng nhu cầu bức thiết hiện nay.

II. SALMONELLA TYPHI - TÁC NHÂN GÂY BỆNH THƯƠNG HÀN

1. Đặc tính hình thái và phân loại



Hình 01: Hình ảnh *Salmonella typhi* dưới kính hiển vi (x100) và kính hiển vi điện tử



Hình 02: Các kháng nguyên bề mặt của *Salmonella*

Salmonellae thuộc họ *Enterobacteriaceae* với chỉ một dòng duy nhất là *Salmonella* và được lấy từ tên nhà khoa học người

Mỹ, D.E. Salmon. Đây là trực khuẩn Gram [-], hiếu khí tùy nghi di động, không tạo bào tử có kích thước khoảng 2-3 0.4-0.6 m.

Salmonella có ba loại kháng nguyên bề mặt (kháng nguyên thân O, kháng nguyên lông H và kháng nguyên độc).

2. Đặc điểm nuôi cấy và sinh hóa định danh

3. Cơ chế gây bệnh

Salmonella xâm nhập vào cơ thể qua đường miệng và hầu hết là do ăn phải thức ăn bị nhiễm như thực phẩm sữa, nước uống.... Sau khi xuyên qua hàng rào acid dạ dày, vi khuẩn di động về phía ruột non và sinh sản ở đó, tiếp tục chui qua màng nhày và vào thành ruột. Các tế bào Paneth của niêm mạc ruột tiết ra một loại peptide có tính chống lại sự xâm nhập của tác nhân gây bệnh.

III. CÁC PHƯƠNG PHÁP CHẨN ĐOÁN THƯỜNG HÀN THÔNG DỤNG

1. Phương pháp nuôi cấy

2. Phương pháp huyết thanh học



Phương pháp
cấy máu

Phát hiện kháng thể hoặc kháng nguyên của *S. typhi* có trong huyết thanh bệnh nhân. Một số thử nghiệm trong phương pháp huyết thanh học như sau:

Thử nghiệm Widal

Thử nghiệm ELISA phát hiện kháng thể đặc hiệu IgM hoặc IgG

VẬT LIỆU

1. Mẫu huyết thanh

a. Huyết thanh nhiễm thương hàn là huyết thanh có kết quả cấy máu dương tính với *S. typhi*: 133 mẫu.

b. Huyết thanh không nhiễm thương hàn: 110 mẫu. Bao gồm huyết thanh có kết quả cấy máu âm tính hoàn toàn (53 mẫu) và huyết thanh có kết quả cấy máu dương tính với tác nhân nhiễm trùng khác, không phải là *S. typhi* (57 mẫu).

Hoá chất, thuốc thử

2. Thiết bị, máy móc

c. Máy tán siêu âm Branson Sonifier 250.

d. Gene Quat pro (Bio Rad).

e. Máy đo OD (Merck).

f. Hệ thống SDS-PAGE và Western blot (Bio-Rad).

PHƯƠNG PHÁP

1. Phương pháp thực hiện thử nghiệm Widal

Nguyên tắc của thử nghiệm Widal là phát hiện sự ngưng kết của kháng thể đối với kháng nguyên O và H của *Salmonella*. Thử nghiệm Widal được thực hiện theo phương pháp ly tâm trong tube

2. Phương pháp thực hiện thử nghiệm Western blot

Protein (kháng nguyên *S. typhi*) được điện di trên SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) nhằm phân tách các thành phần protein theo trọng lượng phân tử. Sau đó, các band protein trên SDS-PAGE được chuyển thẩm lên

màng nitrocellulose và dùng kháng thể đặc hiệu để phát hiện band protein đặc hiệu đã được chuyển lên màng.

3. Phương pháp thực hiện thử nghiệm ELISA

Kháng nguyên được gắn trên bảng nhựa polystyren và được ủ với kháng thể đặc hiệu. Khi đó, kháng thể kết hợp với kháng nguyên để tạo thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Sau khi được ủ với cộng hợp là kháng thể có đánh dấu bằng enzyme sẽ tạo thành phức hợp kháng nguyên - kháng thể- cộng hợp. Phức hợp này được phát hiện bằng chất hiện màu và đo mật độ quang OD450.

4. Phương pháp phân tích dữ liệu

Xác định khả năng phù hợp giữa các nghiệm pháp chẩn đoán

Khả năng phù hợp (hoặc không phù hợp) giữa hai nghiệm pháp chẩn đoán khác nhau được thể hiện qua hệ số kappa. Hệ số kappa có giá trị từ 0-1, khi kappa càng cao thì sự phù hợp càng lớn và ngược lại.

IV. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Tìm hiểu nồng độ cộng hợp và giá trị ngưỡng phát hiện OD450

Thực hiện thử nghiệm ELISA trên 192 mẫu huyết thanh, bao gồm 94 huyết thanh cấy máu dương tính và 98 huyết thanh cấy máu âm tính với *S. typhi* (53 huyết thanh âm tính hoàn toàn, 45 huyết thanh cấy máu dương tính và các tác nhân nhiễm trùng khác).

2. Kết quả các thử nghiệm nhằm xác định "chuẩn vàng"

2.1 Kết quả giữa cấy máu và Widal

Như vậy, kết quả cấy máu dương tính nhưng Widal âm tính với TO (4%) và TH (7%) có thể bệnh nhân nhiễm *S. typhi* nhưng trên thử nghiệm Widal cho kết quả âm tính giả do những nguyên nhân khác nhau như: bệnh nhân vừa mới nhiễm *S. typhi* trong tình trạng mang mầm bệnh nên chưa có kháng thể kháng TO và TH, lượng vi khuẩn xâm nhập chưa đủ để tạo kháng thể...v.v...

2.2 Kết quả thử nghiệm Western blot

Chứng dương là những huyết thanh có đồng thời kết quả cấy máu dương tính với *S. typhi*, kết quả Widal dương tính với TO và TH (16 mẫu).

Chứng âm là những huyết thanh có đồng thời kết quả cấy máu âm tính với *S. typhi*, kết quả Widal âm tính với TO, TH (23 mẫu, trong đó có 14 mẫu cấy máu âm tính hoàn toàn và 9 mẫu cấy máu dương tính với tác nhân khác).

Mẫu thử gồm có 34 mẫu huyết thanh có kết quả sai lệch giữa cấy máu và Widal (TO và TH).

2.3 Xác định chuẩn vàng

Từ kết quả và nhận định như trên, theo chúng tôi chuẩn vàng trong xác định có hay không có nhiễm *S. typhi* như sau:

Nhiễm *S. typhi* khi hoặc (1) cấy máu dương tính, hoặc (2) Western blot dương tính, hoặc (3) cả hai đồng thời dương tính.

Không nhiễm *S. typhi* khi cấy máu và Western blot đồng thời âm tính.

Trên cơ sở chuẩn vàng đã xác định, số lượng mẫu huyết thanh nhiễm

hoặc không nhiễm *S. typhi* mà chúng tôi đã thu nhận như sau:

Nhiễm *S. typhi*
136 mẫu huyết thanh

Không nhiễm *S. typhi*
107 mẫu huyết thanh

XÁC ĐỊNH GIÁ TRỊ CỦA THỬ NGHIỆM ELISA

Nếu như so sánh với các bộ kits ELISA ngoại nhập như: Typhidot M ELISA (độ nhạy cảm: 98%; độ đặc hiệu: 76.6%), PanBio ELISA (độ nhạy cảm: 78%, độ đặc hiệu: 80%), *Salmonella typhi* IgM ELISA (độ nhạy cảm: 80%; độ đặc hiệu: 97%) thì kỹ thuật ELISA do chúng tôi thiết lập có chất lượng không thua kém gì các kits ngoại nhập nêu trên.

KẾT LUẬN

Trên cơ sở so sánh về mức độ phù hợp giữa kết quả thử nghiệm ELISA với kết quả cấy máu thông qua hệ số Kappa, chúng tôi đã xác định nồng độ

cộng hợp tối ưu cho kỹ thuật ELISA là 1/10000 và ngưỡng giá trị phát hiện OD450 là 0.25, tương ứng với nồng độ huyết thanh pha loãng là 1/160.

ĐỀ NGHỊ

Để kỹ thuật ELISA này có thể ứng dụng vào thực tế, chúng tôi đề nghị tiếp tục thực hiện một số việc cụ thể như sau:

Thực hiện thử nghiệm Western blot trên tất cả các huyết thanh đã thu nhận (243 mẫu) để có thể xác định chính xác hơn nữa về độ nhạy cảm và đặc hiệu của thử nghiệm ELISA.

Thực hiện thử nghiệm ELISA trên một số nồng độ huyết thanh pha loãng để từ đó xác định nồng độ kháng thể (huyết thanh) pha loãng ban đầu thích hợp cho thử nghiệm.

Triển khai tại một số bệnh viện để thu nhận ý kiến đóng góp, từ đó cải tiến để thử nghiệm ELISA này phù hợp với thực tiễn hơn.