

**ỨNG DỤNG KHÁNG NGUYÊN TES-30 TÁI TỔ HỢP XÁC ĐỊNH
KHÁNG THỂ IgG TRONG HUYẾT THANH BỆNH NHÂN
NHIỄM TOXOCARA BẰNG KỸ THUẬT ELISA**

*Nguyễn Thị Hà Trinh¹, Nguyễn Minh Quyên², Hoàng Thị Ngọc Diệp²
Hoàng Thị Hòa³, Đỗ Như Bình², Lê Quốc Tuấn^{2*}, Nguyễn Khắc Lực²*

Tóm tắt

Mục tiêu: Sử dụng kháng nguyên TES (Toxocara Excretory-Secretory) tái tổ hợp làm nguyên liệu tạo bộ sinh phẩm ELISA phát hiện kháng thể IgG kháng ấu trùng giun đũa chó/mèo để khắc phục nhược điểm về độ nhạy và độ đặc hiệu thấp khi sử dụng kháng nguyên thô TES. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả bằng thực nghiệm trong phòng thí nghiệm, sử dụng kháng nguyên TES-30 tái tổ hợp biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) chế tạo bộ sinh phẩm ELISA để phát hiện kháng thể IgG kháng ấu trùng giun đũa chó/mèo lưu hành trong máu người. **Kết quả:** Chế tạo thành công bộ sinh phẩm ELISA sử dụng kháng nguyên tái tổ phát hiện các kháng thể IgG kháng *Toxocara* spp... Nồng độ TES-30 tối ưu sử dụng trong phản ứng ELISA là 1 µg/mL, giá trị OD cut-off xác định kết quả dương tính là 0,4 giúp chẩn đoán nhiễm *Toxocara* spp. với độ nhạy 93,3% và độ đặc hiệu đạt 100%. **Kết luận:** Phát triển thành công bộ sinh phẩm ELISA sử dụng TES-30 tái tổ hợp phát hiện kháng thể IgG kháng ấu trùng giun đũa chó/mèo.

Từ khóa: Kháng nguyên tiết Toxocara; Protein tái tổ hợp TES-30; Biểu hiện.

**APPLICATION OF RECOMBINANT TES-30 ANTIGEN TO DETECT
IgG ANTIBODY IN SERA OF TOXOCARIASIS PATIENTS
BY ELISA TECHNIQUE**

Abstract

Objectives: To use recombinant TES protein to improve the quality of the ELISA kit detecting anti-TES IgG in the infected sera to lessen the disadvantages

¹Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột

²Học viện Quân y

³Đại học Điều dưỡng Nam Định

*Tác giả liên hệ: Lê Quốc Tuấn (tuanisation@gmail.com)

Ngày nhận bài: 29/6/2023

Ngày được chấp nhận đăng: 22/8/2023

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v48i7.412>

of raw TES-based ELISA kit as low sensitivity and specificity. **Methods:** Descriptive experimental study in the laboratory using recombinant TES-30 (rTES-30) protein expressed in *E. coli* BL21 (DE3) to develop an ELISA kit to detect IgG antibody in the sera of infected patients. **Results:** A recombinant TES-based ELISA kit has been produced. The concentration of recombinant TES-30 protein was 1 µg/mL and the cut-off value was 0.4. The sandwich ELISA using rTES-30 possessed a sensitive level reaching 93.3% and a specificity of 100%. **Conclusion:** A recombinant TES-based ELISA kit has been successfully developed for human anti-TES IgG detection. This recombinant protein held great potential for developing diagnostic tests for *Toxocariasis* in Vietnam.

Keywords: *Toxocara* spp. excretory/secretory antigen; Recombinant protein TES-30; Expression.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh *Toxocariasis* là sự nhiễm bệnh của con người với ấu trùng giun đũa tròn động vật (*Toxocara canis* từ chó và *Toxocara cati* từ mèo) và đang là vấn đề sức khỏe được quan tâm của cộng đồng khoa học trên thế giới [1, 2]. Đa số người bệnh không có biểu hiện triệu chứng đặc hiệu, triệu chứng chính là ngứa ở da thường gặp ở nhiều bệnh lý khác dẫn tới khó khăn trong việc chẩn đoán [3]. Hiện nay, chẩn đoán nhiễm *Toxocara* spp. được tiến hành phổ biến bằng kỹ thuật ELISA phát hiện kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh. Nhiều bộ kit ELISA sử dụng nguyên liệu là kháng nguyên tiết (*Toxocara* excretory-secretory hay TES antigens) của ấu trùng chiết xuất từ trứng có phôi (embryonated eggs) hoặc giải phóng ra khi nuôi cấy ấu trùng.

Tuy nhiên, do ký sinh trùng có sự chia sẻ kháng nguyên nên việc sử dụng các kháng nguyên tiết dễ dẫn đến sự phản ứng chéo với kháng nguyên của loài khác, gây ảnh hưởng đến kết quả chẩn đoán [4, 5]. Ngoài ra, sử dụng kháng nguyên thô thu từ môi trường nuôi ấu trùng có nhược điểm là không có sự ổn định về năng suất và chất lượng. Các nghiên cứu cho thấy sử dụng kháng nguyên tiết tái tổ hợp làm nguyên liệu tạo bộ sinh phẩm ELISA đã khắc phục được các nhược điểm của kháng nguyên thô. Ứng dụng công nghệ DNA tái tổ hợp, chúng tôi đã biểu hiện thành công protein kháng nguyên TES-30 trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) nhằm: *Xác định kháng thể IgG lưu hành trong huyết thanh của bệnh nhân (BN) bị nhiễm Toxocara bằng kỹ thuật ELISA.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

* *Đối tượng nghiên cứu:* Bộ sinh phẩm ELISA sử dụng protein tái tổ hợp TES-30 làm nguyên liệu phủ giếng để phát hiện kháng thể IgG đặc hiệu trong huyết thanh BN mắc bệnh *Toxocariasis*.

Các tham số được thăm dò bao gồm: Nồng độ tối ưu của kháng nguyên để phủ giếng; giá trị cut-off; mức độ tương đồng với bộ kit ELISA thương mại thường dùng; khả năng phản ứng chéo với huyết thanh dương tính với một số giun sán thường gặp.

* *Thời gian và địa điểm nghiên cứu:*

- Thời gian: Từ tháng 01/2022 - 01/2023.

- Địa điểm: Labo công nghệ cao, Bộ môn Ký sinh trùng và Côn trùng, Học viện Quân y; phòng xét nghiệm Ký sinh trùng và Vi nấm, Bệnh viện Quân y 103; Bộ môn Ký sinh trùng và Côn trùng, Học viện Quân y.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Thiết kế nghiên cứu:* Nghiên cứu mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

* *Cỡ mẫu và chọn mẫu:*

- Thăm dò nồng độ kháng nguyên TES tối ưu để phủ giếng: 30 mẫu huyết

thanh âm tính và 96 mẫu huyết thanh của BN dương tính với *Toxocara*; 30 mẫu huyết thanh dương tính với loại giun sán thường gặp khác. Các huyết thanh được pha loãng theo tỷ lệ 1/10.

- Xác định giá trị cut-off; mức độ tương đồng với bộ kit ELISA thương mại thường dùng; khả năng phản ứng chéo: 30 mẫu huyết thanh *Toxocara* (+); 30 mẫu huyết thanh sán lá gan lớn (+); 30 mẫu huyết thanh sán dây lợn (+); 30 mẫu huyết thanh giun lợn (+); 30 mẫu huyết thanh ở người khỏe mạnh. So sánh đối chứng với kit ELISA thương mại đang sử dụng để chẩn đoán nhiễm *Toxocara* ở các cơ sở y tế.

* *Nguyên vật liệu, hóa chất và sinh phẩm:*

- Nguyên vật liệu phủ giếng ELISA: Kháng nguyên tái tổ hợp TES-30 nồng độ 1 µg/mL là sản phẩm của đề tài cấp Bộ Y tế “Nghiên cứu chế tạo kháng nguyên TES tái tổ hợp và ứng dụng chế tạo sinh phẩm ELISA phát hiện kháng thể IgG kháng ấu trùng gây bệnh giun đũa chó mèo ở người (*Toxocariasis*)” mã số 5888_2019.

- Các hóa chất, sinh phẩm: Anti human IgG4-Fc; đĩa ELISA; dung dịch đệm phủ giếng; dung dịch rửa PBS-T: PBS chứa 0,1% Tween-20; cơ chất: ABST; blocking buffer...

* *Trang thiết bị, máy móc:* Máy ELISA bán tự động (Biotek); máy rửa ELISA (Elx508, Biotek); máy vortex (Rotolab, OSI); máy đọc màu; Micropipette các loại Eppendorf (Mỹ)...

* *Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:*

- Xác định lượng kháng nguyên TES-30 sau tinh sạch phủ lên giếng ELISA: Các lượng khác nhau của kháng nguyên sẽ được cố định lên giếng và sau đó cho phản ứng với mẫu huyết thanh dương tính và mẫu huyết thanh âm tính. Kết quả các phép thử ELISA này sẽ cho phép lựa chọn được lượng kháng nguyên cần cố định lên giếng. Xác định được hệ số pha loãng phù hợp là độ pha loãng cho giá trị mật độ quang lớn nhất.

- Xác định giá trị cut-off và OD ngưỡng: Để xác định giá trị cut-off, 30 mẫu huyết thanh âm tính và 30 mẫu huyết thanh dương tính sẽ được sử dụng trong quy trình ELISA.

- Các bước tiến hành kỹ thuật ELISA:

Bước 1 (Ủ kháng nguyên - Coating): Tra kháng nguyên 100 μL /giếng theo sơ đồ; ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ; hút bỏ dung dịch kháng nguyên khỏi các giếng; thấm khô bằng giấy thấm và rửa các giếng bằng washing buffer PBS-T, 200 μL /giếng, rửa lắc 3 phút, thực hiện 3 lần.

Bước 2 (Phủ các giếng - Blocking): Tra blocking buffer (1% BSA in PBS-T), 200 μL /giếng, ủ ở 37°C, 1 giờ; rửa 3 lần bằng 200 μL washing buffer có 0,1% Tween-20 (PBS-T); rửa lần cuối bằng PBS; làm khô tối đa bằng giấy thấm và giữ ẩm các giếng.

Bước 3 (Ủ kháng thể 1 - huyết thanh của BN): Pha loãng huyết thanh trong blocking buffer; cho vào mỗi giếng 100 μL huyết thanh (đã pha loãng); ủ ở nhiệt độ phòng hoặc 37°C trong 1h; rửa 3 lần bằng 150 μL washing buffer có 0,1% Tween-20 (PBS-T); rửa lần cuối bằng PBS và làm khô tối đa bằng giấy thấm.

Bước 4 (Ủ kháng thể 2 - Mouse anti-Human IgG4 Fc Secondary Antibody gắn HRP): Pha loãng kháng thể 2 ở 1/250 trong blocking buffer; cho kháng thể 2 (đã pha loãng) vào các giếng: 100 μL /giếng; ủ ở nhiệt độ phòng 30 - 60 phút; rửa 3 lần bằng 200 μL washing buffer có 0,1 - 0,05% Tween-20 (PBS-T); rửa lần cuối bằng PBS.

Bước 5 (Ủ cơ chất và hiện màu): Nhỏ vào mỗi giếng 100 μL dung dịch hiện màu là cơ chất 1-Step™ ABTS Substrate Solution, để 30 phút ở nhiệt độ phòng tối (nhà sản xuất đề xuất 20 phút); dừng phản ứng và đọc kết quả ở bước sóng 405nm. Giá trị cut-off sẽ là mật độ quang trung bình của các mẫu

nêu trên sau đó tìm giá trị OD ngưỡng chẩn đoán dương tính với nhiễm *Toxocara* bằng đường cong ROC.

- Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng ELISA: Sử dụng huyết thanh của BN nhiễm *Toxocariasis* và các loài giun sán khác như giun móc, giun lợn, giun đũa người, sán dây lợn để đánh giá độ nhạy và đặc hiệu của bộ sinh phẩm chẩn đoán.

* *Xử lý số liệu*: Các dữ liệu sinh học được xử lý bằng các phần mềm thống kê chuyên dụng để làm sạch và thu nhận dữ liệu nghiên cứu. Giá trị cut-off

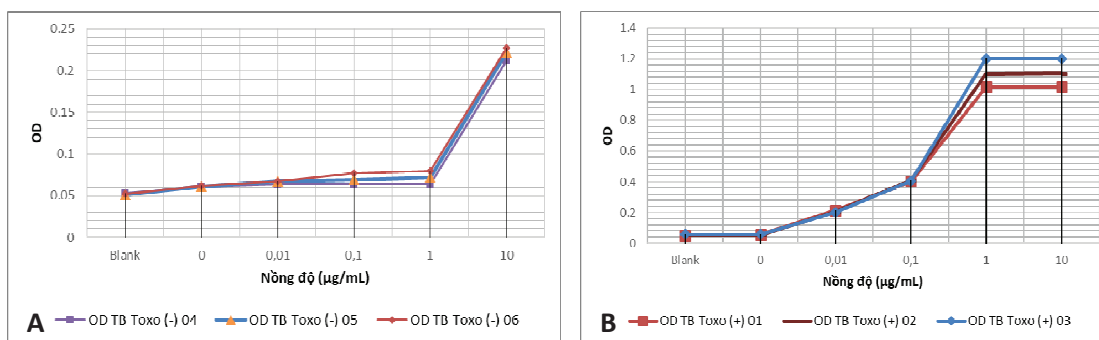
được tính bằng 2 phương pháp: Phân tích giá trị trung bình ($M + 3SD$) và phân tích đường cong ROC. Phân tích khả năng phản ứng chéo, mức độ tương đồng trong xét nghiệm bằng chỉ số Kappa.

3. Đạo đức nghiên cứu

Đây là nghiên cứu thực nghiệm sử dụng các mẫu huyết thanh lưu trữ, không có can thiệp trên BN. Nhóm nghiên cứu cam kết bảo mật thông tin các mẫu huyết thanh sử dụng và không dùng cho mục đích khác ngoài nghiên cứu này.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả xác định lượng kháng nguyên tái tổ hợp TES-30 tối ưu dùng trong phản ứng ELISA



Biểu đồ 1. Giá trị OD đo được khi sử dụng kháng nguyên TES-30 tái tổ hợp ở dải nồng độ từ 0,1 - 10 µg/mL với các mẫu âm tính (A) và mẫu dương tính (B).

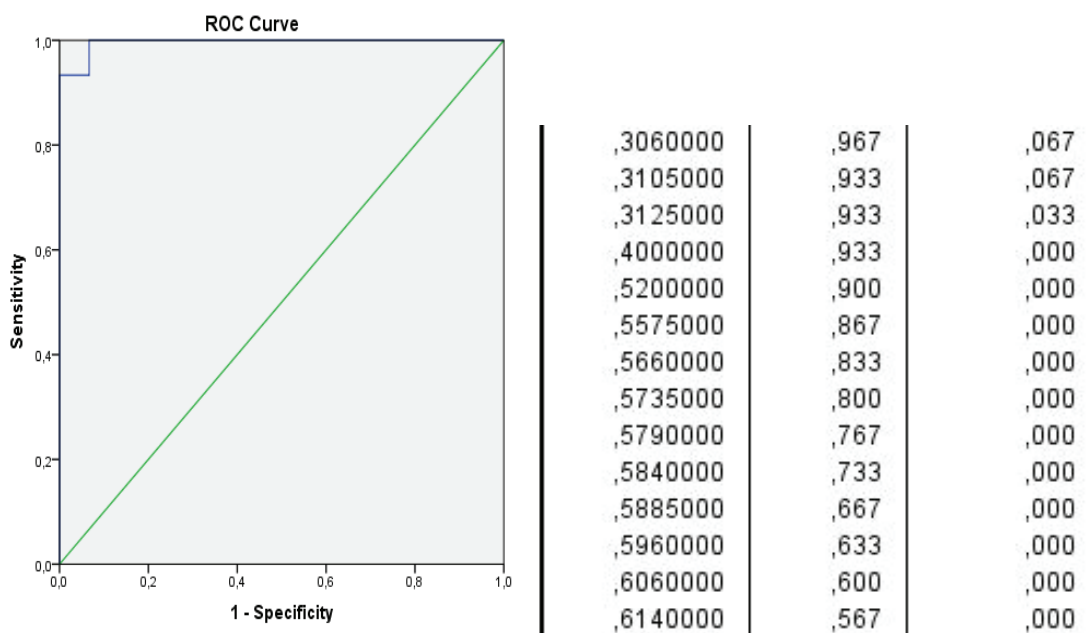
Đối với các mẫu âm tính, giá trị OD được xác định trong dải nồng độ TES-30 < 1 µg/mL đều < 0,1; tuy nhiên, giá trị OD đo được ở nồng độ TES-30 10 µg/mL có hiện tượng tăng cao bất thường (> 0,2). Tại nồng độ 10 µg/mL gây nhiễu khi đọc giá trị OD trong xét nghiệm.

Đối với các mẫu dương tính, giá trị OD ghi nhận tăng đều trong dải nồng độ dưới 1 µg/mL, tại nồng độ 10 µg/mL chỉ ghi nhận giá trị OD tương đương với giá trị OD tại nồng độ TES-30 là 1 µg/mL. Do đó, việc sử dụng nồng độ TES-30 1 µg/mL đã đủ chẩn đoán nhiễm *Toxocariasis*. Từ quá trình xác định nồng độ giữ cho OD ở baseline và OD ở plateau, rút ra nồng độ TES-30 tái tổ hợp 1 µg/mL là tối ưu.

Khi tiến hành các thử nghiệm tương tự xác định độ pha loãng huyết thanh, kết quả cho thấy độ pha loãng là 1/50 cho giá trị OD trong khoảng > 1, đảm bảo hạn chế yếu tố nhiễu (dữ liệu không thể hiện).

2. Kết quả xác định giá trị cut-off và OD ngưỡng của phản ứng ELISA

Tiến hành đo OD của 30 mẫu huyết thanh âm tính và 30 mẫu huyết thanh dương tính, từ kết quả phân tích đường cong ROC cho thấy giá trị OD trong chẩn đoán *Toxocara spp.* thu được diện tích dưới đường cong là 0,99 ($p < 0,001$). Trong đó xác định được giá trị OD cut-off là 0,4, đạt ngưỡng chẩn đoán nhiễm *Toxocara spp.* với độ nhạy 93,3% và độ đặc hiệu đạt 100%.



Biểu đồ 2. Đường cong ROC giá trị OD chẩn đoán *Toxocara spp.*

3. Kết quả xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng ELISA sử dụng kháng nguyên TES-30 tái tổ hợp

Bảng 1. Kết quả phản ứng chéo với mẫu huyết thanh nhiễm *Toxocara*-sán lá gan lớn.

Chẩn đoán <i>Toxocara</i>		Kít thương mại		Kappa (95% CI)
		Dương tính	Âm tính	
Mẫu <i>Toxocara</i> - sán lá gan lớn	Dương tính	30	1	0,967 (0,897 - 1)
	Âm tính	0	29	

Khả năng chẩn đoán chính xác mẫu huyết thanh nhiễm *Toxocariasis* đạt độ phù hợp cao với hệ số Kappa là 0,967.

Bảng 2. Kết quả phản ứng chéo với mẫu huyết thanh nhiễm *Toxocara*-sán dây lợn.

Chẩn đoán <i>Toxocara</i>		Kít thương mại		Kappa (95% CI)
		Dương tính	Âm tính	
Mẫu <i>Toxocara</i> - sán dây lợn	Dương tính	30	2	0,933 (0,831 - 1)
	Âm tính	0	28	

Khả năng chẩn đoán chính xác mẫu huyết thanh nhiễm *Toxocara* với nhiễm sán dây lợn đạt độ phù hợp cao với hệ số Kappa là 0,933.

Bảng 3. Kết quả phản ứng chéo với mẫu huyết thanh nhiễm *Toxocara*-giun lợn.

Chẩn đoán <i>Toxocara</i>		Kít thương mại		Kappa (95% CI)
		Dương tính	Âm tính	
Mẫu <i>Toxocara</i> - giun lợn	Dương tính	30	1	0,967 (0,897 - 1)
	Âm tính	0	29	

Khả năng chẩn đoán chính xác mẫu huyết thanh nhiễm *Toxocariasis* với nhiễm giun lợn đạt độ phù hợp cao với hệ số Kappa là 0,967.

BÀN LUẬN

Loại kháng nguyên TES được tạo ra bằng con đường tái tổ hợp đầu tiên là TES-30 theo nghiên cứu của Yamasaki H. và CS (1998) [5]. Kết quả phân tích Western blot của TES-30 tái tổ hợp với huyết thanh của chuột và của BN cho kết quả phát hiện chính xác các mẫu huyết thanh dương tính với *T. canis* và *T. cati*. Khi thử nghiệm độ đặc hiệu với 5 loại kháng thể của người mắc 5 loại giun khác, TES-30 tái tổ hợp cho kết quả đặc hiệu với 3 loại trong khi 2 loại còn lại cho kết quả phản ứng chéo với cường độ rất thấp với một loại ký sinh trùng đường ruột khác là *Anisakis* spp. [5, 6].

Trong một nghiên cứu khác của Norhaida A. và CS, TES-30 tái tổ hợp biểu hiện trong vector pPROEX-HT qua phân tích Western blot cho thấy phản ứng chính xác với kháng thể IgG4 có trong các mẫu huyết thanh người dương tính với bệnh giun đũa chó mèo, đồng thời không phản ứng chéo với huyết thanh của người mắc 2 loại giun tròn khác cũng như người hiến máu tình nguyện khỏe mạnh. Như vậy so với nghiên cứu trước của Yamasaki và CS (1998), kháng thể cộng hợp kháng IgG ở phân lớp 4 cho kết quả đặc hiệu hơn kháng thể IgG tổng số [7].

Trong nghiên cứu này, TES-30 tái tổ hợp đã được kiểm chứng bằng Western blot và Dot blot cho thấy có hoạt tính kháng nguyên đặc hiệu với huyết thanh người nhiễm ấu trùng giun đũa chó mèo và không có phản ứng chéo với các loài giun sán khác. Tiếp tục ứng dụng kháng nguyên để xác định kháng thể IgG trong huyết thanh BN nhiễm *Toxocariasis* bằng phản ứng ELISA cho thấy ở nồng độ 1,0 µg/mL kháng nguyên TES-30 tái tổ hợp có khả năng nhận diện được kháng thể IgG trong huyết thanh ở độ pha loãng 1/50 và ngưỡng chẩn đoán nhiễm *Toxocara* spp. là 0,4 với độ nhạy 93,3%, độ đặc hiệu đạt 100%. Đánh giá phản ứng chéo với các mẫu huyết thanh dương tính với một số giun sán thường gặp (sán lá gan lớn, sán dây lợn, và giun lươn) cho thấy độ phù hợp cao. Điều này chứng tỏ chúng tôi đã thiết lập thành công phương pháp ELISA sử dụng kháng nguyên TES-30 tái tổ hợp tự sản xuất để xác định kháng thể IgG trong huyết thanh BN nhiễm *Toxocara*.

KẾT LUẬN

Kháng nguyên tái tổ hợp TES-30 tổng hợp trong vi khuẩn *E.coli* BL21 (DE3) để xác định kháng thể IgG lưu hành trong máu của BN bị nhiễm *Toxocara* spp. bằng kỹ thuật ELISA có

độ nhạy đạt 93,3%, độ đặc hiệu là 100%. Kết quả góp phần quan trọng trong cung cấp nguồn nguyên liệu để tạo các sinh phẩm chẩn đoán nhanh giúp chẩn đoán và phòng bệnh giun đũa chó mèo ở người (*Toxocariasis*) ở người.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Y tế và là sản phẩm thuộc đề tài “Nghiên cứu chế tạo kháng nguyên TES tái tổ hợp và ứng dụng chế tạo sinh phẩm ELISA phát hiện kháng thể IgG kháng ấu trùng gây bệnh giun đũa chó mèo ở người (*Toxocariasis*)” mã số 5888-2019.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Smith H, Holland C, Taylor M, Magnaval JF, Schantz P, Maizels R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends in Parasitology*. 2009; 25(4): 182-188.
2. Trần Thị Kim Dung, Trần Phú Mạnh Siêu. Bệnh do giun lợn và giun đũa chó mèo. *Nhà xuất bản Y học*. 2009: 82-107.
3. Fillaux J, Magnaval JF. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Vet. Parasitol*. 2013; 193:327-336.
4. Moreira GMSG, Telmo P de L, Mendonça M, Moreira Ângela Nunes, McBride AJA, Scaini CJ, et al. Human toxocariasis: Current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends Parasitol*. 2014; 30(9):456-464.
5. Yamasaki H, et al. Molecular characterization of a cDNA encoding an excretory-secretory antigen from *Toxocara canis* second stage larvae and its application to the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol. Int*. 1998; 47:171-181.
6. Yamasaki H, et al. Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *J. Clin. Microbiol*. 2000; 38:1409-1413.
7. Norhaida A, et al. rTES-30USM: Cloning via assembly PCR, expression, and evaluation of usefulness in the detection of toxocariasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 2008; 102:151-160.