

Nghiên cứu chế tạo kháng thể từ lòng đỏ trứng gà kháng trực khuẩn mũ xanh bằng phương pháp gây miễn dịch cho gà mái đẻ trứng

Tim Sunnary*; Đỗ Minh Trung**
Lê Thu Hồng***; Lê Văn Đông**

TÓM TẮT

Nhiễm trực khuẩn mũ xanh (TKMX) (*Pseudomonas aeruginosa*) là vấn đề quan trọng, đặc biệt khi vi khuẩn (VK) này đã có dấu hiệu kháng nhiều loại kháng sinh. Đề tài này được tiến hành nhằm chế tạo kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng kháng TKMX bằng phương pháp gây miễn dịch cho gà mái và thu hoạch kháng thể từ trứng gà thay cho phương pháp truyền thống trên ngựa. Kết quả gây miễn dịch cho gà mái với hỗn hợp kháng nguyên của 7 chủng TKMX thuộc 5 týp huyết thanh gây bệnh chủ yếu ở Việt Nam theo phương pháp tiêm dưới da nhắc lại nhiều lần đã thu được IgY đặc hiệu cả trong máu và trong trứng gà. Sản phẩm IgY tách chiết từ lòng đỏ trứng gà gây miễn dịch đẻ ra có phản ứng đặc hiệu với cả 7 chủng TKMX gây miễn dịch qua thử nghiệm bằng phản ứng ELISA và ngưng kết VK với mức độ phản ứng khác nhau giữa các chủng TKMX.

* Từ khóa: Trực khuẩn mũ xanh; Kháng thể IgY; Sản xuất kháng thể.

Production of egg yolk antibody against pseudomonas aeruginosa by immunization of egg laying hen

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa infections are important issue, especially when there are signs of multi-drug resistance to various antibiotics. This research was carried out to produce egg yolk antibody (IgY) to P. aeruginosa by immunization of hen with bacterial antigen then harvest specific antibody in egg, instead of traditional method such as horse immunization. By hyper-immunization of hen with a mixture of fixed bacterial antigen of seven strains of P. aeruginosa from 5 common serotypes in Vietnam via repeated injections subcutaneously, we have successfully produced specific antibody in blood as well as in chicken eggs. The IgY extracted from eggs of the hyper-immunized hen show specific reaction to all seven strains as tested by ELISA and bacterial aggregation assays with the reactivity varies among the tested strains.

* Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; IgY antibody; Antibody production.

* Nghiên cứu sinh Lào

** Học viện Quân y

*** Bệnh viện 103

Phản biện khoa học: TS. Nguyễn Đặng Dũng

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm khuẩn bệnh viện do TKMX đang là vấn đề quan trọng cần được giải quyết do VK này có khả năng gây nhiễm mạnh, đặc biệt là nhiễm khuẩn huyết gây tử vong cao. Điều này càng cấp bách hơn khi VK đã có dấu hiệu kháng nhiều loại kháng sinh, đòi hỏi cần có những biện pháp điều trị hiệu quả hơn như trị liệu miễn dịch sử dụng huyết thanh kháng TKMX [1]. Theo hướng nghiên cứu này, Học viện Quân y đã phân lập được các chủng TKMX thuộc 5 týp huyết thanh gây bệnh chủ yếu từ các bệnh viện thuộc cả 3 miền Bắc, Trung, Nam. Các chủng VK này được sử dụng làm kháng nguyên để chế tạo huyết thanh kháng TKMX bằng phương pháp truyền thống gây miễn dịch cho ngựa và chế tạo thành chế phẩm kháng thể dùng để tẩm đắp và rửa vết thương, vết bỏng [2, 4]. Tuy nhiên, công nghệ chế tạo kháng thể truyền thống này có nhược điểm là phải lấy máu ngựa để tách huyết tương, sau đó tinh chế kháng thể, nên lượng kháng thể thường hạn chế, quy trình sản xuất phức tạp.

Gà có khả năng sinh kháng thể đặc hiệu với mầm bệnh tương tự như động vật có vú. Các kháng thể đặc hiệu từ máu gà mái được chuyển qua và tích tụ trong lòng đỏ trứng mà chúng đẻ ra. Lớp kháng thể có trong lòng đỏ trứng được gọi là kháng thể IgY (*yolk immunoglobulin*). Để sản xuất IgY đặc hiệu, chỉ cần gây miễn dịch cho gà mái và thu hoạch trứng do chúng đẻ ra là có kháng thể. Đề tài này được tiến hành nhằm mục tiêu *chế tạo kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng gà kháng TKMX bằng phương pháp gây miễn dịch cho gà mái làm nguyên liệu chế tạo chế phẩm điều trị vết thương nhiễm TKMX.*

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu.

* *Động vật thí nghiệm:*

9 gà mái giống Gà trắng Ai Cập, độ tuổi sắp đẻ trứng, cân nặng trung bình $1,0 \pm 0,1$ kg, được gây miễn dịch với các loại bệnh do virus thường gặp ở gà. Gà do Viện Chăn nuôi Quốc gia cung cấp, nuôi trong điều kiện vệ sinh tốt, dư thừa thức ăn, nước uống và chiếu sáng tự nhiên tại Ban Chăn nuôi động vật thí nghiệm, Học viện Quân y trong suốt thời gian tiến hành thí nghiệm.

* *VK TKMX:*

7 chủng có ký hiệu 1100P2, 79P16, MT27P11, 79P11, 9HP13, 7P8 và 36P8 thuộc 5 týp huyết thanh thường gây bệnh ở Việt Nam được phân lập từ vết bỏng ở các bệnh viện thuộc cả 3 miền trong cả nước, là sản phẩm của đề tài nghiên cứu cấp Bộ Y tế do Học viện Quân y chủ trì, được Bộ môn - Khoa Vi Sinh vật, Bệnh viện 103 cung cấp.

* *Hóa chất:*

Tá chất Freund hoàn chỉnh và không hoàn chỉnh, cộng hợp kháng thể cừu kháng IgY gà gắn enzym peroxidase, cơ chất OPD và hóa chất vật tư tiêu hao dùng cho nuôi cấy TKMX, gây miễn dịch, phản ứng ELISA đều đạt tiêu chuẩn phân tích (hãng Sigma, BioRad và Merck).

2. Phương pháp nghiên cứu.

* *Gây miễn dịch cho gà mái tạo kháng thể:*

Thu hoạch các chủng TKMX sau khi nuôi cấy trong môi trường BHI, rửa bằng nước muối sinh lý, phối trộn đều 7 chủng ở cùng tỷ lệ thể tích và mật độ. Hỗn hợp VK được bất hoạt bằng dung dịch phenol 0,5% pha trong nước muối sinh lý ở 37°C trong 24 giờ. VK sau bất hoạt, rửa loại bỏ phenol, pha vào dung dịch nước muối sinh lý rồi trộn với tá chất freund theo tỷ lệ 1:1 về thể tích thành huyền dịch kháng nguyên để gây miễn dịch cho gà mái bằng cách tiêm vào dưới da trước cơ ngực lớn theo quy trình tiêm nhiều mũi nhắc lại. Nồng độ kháng nguyên gây miễn dịch là 10^6 (lô 1: 3 gà), 10^7 (lô 2: 3 gà), 10^8 (lô 3: 3 gà) VK/gà/lần tiêm. Mũi tiêm thứ nhất sử dụng tá chất freund hoàn chỉnh, các mũi tiêm sau sử dụng tá chất freund không hoàn chỉnh. Khoảng cách giữa các lần tiêm 3 tuần. Trước khi gây miễn dịch lần một và 7 ngày sau khi gây miễn dịch các lần sau, tiến hành lấy máu tĩnh mạch cánh gà, tách huyết tương để làm xét nghiệm ELISA phát hiện kháng thể đặc hiệu trong máu gà. Thu hoạch trứng gà, đánh dấu số gà, ngày đẻ trứng và bảo quản ở 4°C liên tục cho đến khi sử dụng.

** Tách chiết kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng:*

Tách chiết kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng theo quy trình được Ko (2006) mô tả và chúng tôi đã cải tiến trong nghiên cứu trước cho phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm [3, 5]. Lấy cùng một lượng trứng như nhau ở các lô nghiên cứu, tách lòng đỏ đánh tan thành huyền dịch. Pha loãng với nước cất đã chỉnh pH = 6,0 với tỷ lệ thể tích 1 lòng đỏ trứng:9 nước cất rồi để qua đêm ở 4°C để loại bỏ lipid. Thu phần dịch nổi, lọc qua giấy lọc Whatman No 1. Kết tủa dung dịch lọc chứa IgY với $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nồng độ 40% bão hòa ở 4°C trong 2 giờ. Ly tâm bỏ dịch nổi thu phần cặn chứa IgY. Hòa tan phần cặn thu được trong PBS rồi thẩm tích loại muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ thay bằng dung dịch nước muối sinh lý. Xác định nồng độ protein của sản phẩm sau mỗi bước tách chiết bằng phương pháp Bradford. Khảo sát hoạt tính của kháng thể IgY đặc hiệu với TKMX bằng xét nghiệm ELISA và thử nghiệm gây ngưng kết VK.

** Phản ứng ELISA phát hiện kháng thể IgY kháng TKMX:*

Xử lý kháng nguyên hỗn hợp 7 chủng TKMX đã dùng để gây miễn dịch hoặc từng chủng riêng rẽ bằng phương pháp siêu nghiền với máy siêu âm. Gắn các chế phẩm kháng nguyên siêu nghiền vào giếng ELISA nồng độ 5 µg/ml trong dung dịch NaHCO_3 nồng độ 0,1M, pH 9,6 và ủ qua đêm ở 4°C. Rửa plate 5 lần bằng dung dịch đệm PBS-T (0,15 M NaCl; 0,02 M NaH_2PO_4 ; 0,01% Tween 20, pH 7,4), sau đó che phủ các vị trí không gắn kháng nguyên bằng 150 µl/giếng dung dịch albumin huyết thanh bò (BSA) 1% ở 37°C trong 2 giờ. Rửa plate 5 lần với PBS-T. Pha loãng huyết tương gà hoặc chế phẩm chứa IgY tách chiết từ lòng đỏ trứng gà với những nồng độ khác nhau và cho vào các giếng với cùng thể tích (100 µl/giếng). Ủ ở 37°C trong 30 phút, sau đó rửa bỏ các thành phần không bám vào giếng. Phát hiện kháng thể IgY đặc hiệu bằng cộng hợp kháng thể cừu kháng IgY gà gắn enzym peroxidase. Ủ cộng hợp ở 37°C trong 30 phút, sau đó rửa bỏ cộng hợp, không gắn vào giếng và cho vào các giếng 100 µl dung dịch cơ chất OPD nồng độ 0,5 mg/ml pha trong dung dịch cơ chất. Đo mật độ quang học của các giếng bằng máy đọc DTX 880 (Beckman Coulter, Mỹ) ở bước sóng 450 nm. Quy ước ngưỡng dương tính khi OD của mẫu thử lớn hơn giá trị trung bình Mean + 2SD của những giếng chứng âm được tiến hành đồng thời trong cùng lần xét nghiệm ELISA.

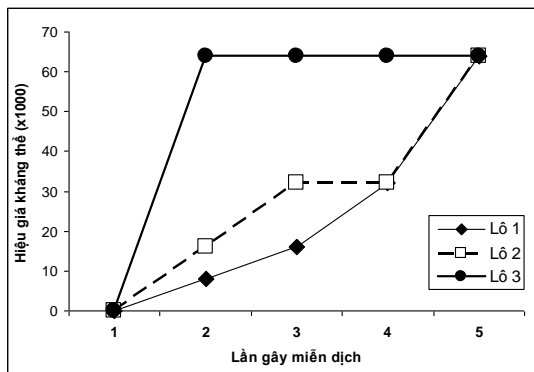
** Phản ứng ngưng kết:*

Tiến hành phản ứng ngưng kết: nghiền tan 1 khuẩn lạc TKMX trong 50 μ l nước muối sinh lý vô trùng rồi trộn đều với 50 μ l dung dịch kháng thể ở các nồng độ khác nhau trên lam kính. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó quan sát hiện tượng ngưng kết bằng mắt thường hoặc bằng kính hiển vi.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kháng thể IgY đặc hiệu với TKMX trong máu gà.

Xét nghiệm ELISA phát hiện IgY đặc hiệu trong máu gà trước khi gây miễn dịch lần thứ nhất và sau các lần gây miễn dịch từ thứ hai đến thứ năm khi cho phản ứng với hỗn hợp kháng nguyên siêu nghiền của 7 chủng TKMX.

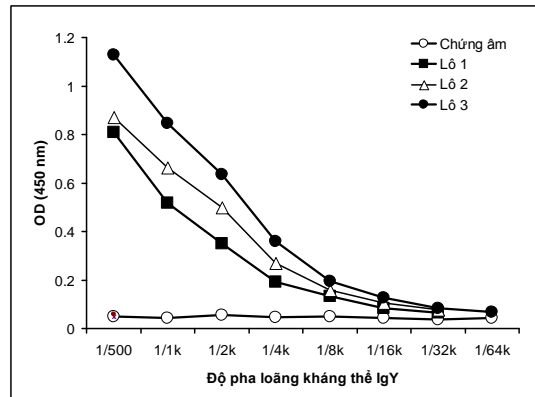


Hình 1: Biến động hiệu giá IgY đặc hiệu TKMX trong máu gà.

Trước khi gây miễn dịch, không có phản ứng của kháng thể IgY kháng TKMX trong máu ở cả 3 lô gà. Sau lần gây miễn dịch thứ hai, đã xuất hiện kháng thể IgY kháng TKMX trong máu cả 3 lô gà, trong đó, hiệu giá kháng thể ở lô 3 đạt cao nhất (64.000) và duy trì liên tục sau những lần gây miễn dịch nhắc lại. Hiệu giá kháng thể ở lô 1 và 2 tăng chậm hơn, chỉ đạt 64.000 sau lần gây miễn dịch thứ năm. Chứng tỏ gây miễn dịch ở nồng độ VK 10^8 (lô 3) kích thích sinh kháng thể nhanh và mạnh hơn so với gây miễn dịch ở nồng độ VK 10^6 (lô 1) và 10^7 (lô 2).

2. Kháng thể IgY đặc hiệu với TKMX trong trứng gà.

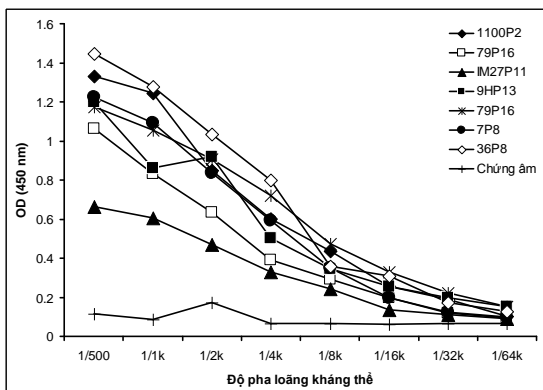
Hoạt tính kháng thể IgY sau tách chiết từ lòng đỏ trứng được hoàn nguyên về thể tích lòng đỏ ban đầu, sau đó pha loãng với những mức pha loãng khác nhau, tiến hành phản ứng ELISA với hỗn hợp kháng nguyên siêu nghiền của 7 chủng VK.



Hình 2: Hoạt tính IgY đặc hiệu TKMX trong lòng đỏ trứng gà để sau lần gây miễn dịch thứ năm.

Không có hoạt tính kháng thể IgY kháng TKMX trong trứng do gà không gây miễn dịch để ra. Các mẫu trứng thu được ở cả 3 lô sau khi gây miễn dịch với kháng nguyên TKMX lần năm đều cho phản ứng dương tính, trong đó hoạt tính kháng thể mạnh nhất ở lô 3. Chứng tỏ IgY đặc hiệu với TKMX đã chuyển từ máu gà sang tích lũy trong lòng đỏ trứng gà, đồng thời gây miễn dịch ở nồng độ 10^8 VK/gà/lần tiêm (lô 3) cho hoạt tính kháng thể trong trứng mạnh nhất, tương đương với hiệu giá kháng thể IgY trong huyết tương gà cao nhất.

3. Hoạt tính IgY kháng từng chủng TKMX riêng rẽ.



Hình 3: Hoạt tính IgY trong lòng đỏ trứng gà kháng từng chủng TKMX.

Hoạt tính IgY kháng đa giá với 7 chủng TKMX khi thử riêng rẽ với từng chủng có mức độ phản ứng không giống nhau. Phản ứng mạnh nhất với các chủng 1100P2 và 36P8; phản ứng trung bình với các chủng 79P16, 9HP13, 79P11 và 7P8; thấp nhất đối với chủng M27P11. Chế phẩm IgY tách chiết từ lòng đỏ trứng gà nuôi trong cùng điều kiện nhưng không gây miễn dịch với kháng nguyên TKMX cho kết quả âm tính.

4. Hoạt tính gây ngưng kết TKMX.

Bảng 1: Hoạt tính ngưng kết từng chủng TKMX của IgY kháng TKMX.

CHỦNG	6P11	M27P11	79P16	9HP13	7P8	1100P2	P38
-------	------	--------	-------	-------	-----	--------	-----

SỐ							
Hoạt tính ngưng kết	(+++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)

Mặc dù ở nồng độ này, dung dịch IgY có khả năng gây ngưng kết cả 7 chủng VK được khảo sát, nhưng hoạt tính gây ngưng kết cũng khác nhau giữa các chủng. Kháng thể có hoạt tính ngưng kết mạnh nhất đối với những chủng thuộc týp huyết thanh P11 (chủng 6P11 và M27P11), ngưng kết tương đối tốt với các chủng thuộc týp huyết thanh P16 và P13 (chủng 79P16, 9HP13), ngưng kết yếu hơn với các chủng thuộc týp huyết thanh P8 và P2 (chủng 7P8, 36P8 và 1100P2).

So sánh hoạt tính phản ứng ELISA với kháng nguyên siêu nhiễm và hoạt tính gây ngưng kết VK với kháng nguyên VK nguyên vẹn cho thấy: không có sự tương đồng giữa khả năng phản ứng trên ELISA với khả năng ngưng kết VK. Những chủng thuộc týp huyết thanh P2 và P8 có phản ứng ELISA dương tính mạnh, nhưng ngưng kết yếu VK. Ngược lại, chủng thuộc týp huyết thanh P11 có phản ứng ELISA dương tính yếu, nhưng lại ngưng kết VK mạnh. Điều này có thể do tác dụng gây ngưng kết VK là tác dụng của kháng thể bám vào kháng nguyên trên bề mặt VK, còn phản ứng ELISA đánh giá hoạt tính của kháng thể chống lại kháng nguyên siêu nhiễm (bao gồm cả các kháng nguyên bề mặt và kháng nguyên nội bào VK). Mặt khác, kết quả này cho thấy, mặc dù gây miễn dịch với kháng nguyên là VK nguyên vẹn được bất hoạt, nhưng hệ thống miễn dịch của gà đã xử lý những kháng nguyên này thành mảnh kháng nguyên nhỏ hơn, làm bộc lộ cả kháng nguyên bề mặt và kháng nguyên nội bào. Nghiên cứu này chưa chỉ ra được thành phần kháng nguyên nào của TKMX có tính sinh miễn dịch mạnh nhất với cơ thể gà. Để trả lời câu hỏi này, cần nghiên cứu sâu hơn bằng các kỹ thuật như Western blot hoặc tách phân đoạn kháng nguyên màng, kháng nguyên bào tương của VK trước khi phân tích bằng thuật ELISA. Theo Nilsson và CS (2007), flagellin - một thành phần cấu trúc bên ngoài của TKMX là yếu tố chính liên quan đến khả năng lây nhiễm của VK này [7]. Liệu chế phẩm IgY có khả năng ngưng kết được TKMX đã có tác dụng ức chế và/hoặc tiêu diệt được VK này hay chưa và có tác động vào flagellin hay không? Cần có nhiều nghiên cứu tiếp theo để làm sáng tỏ vấn đề này.

KẾT LUẬN

Đã chế tạo được kháng thể IgY kháng TKMX bằng phương pháp gây miễn dịch cho gà mái với hỗn hợp kháng nguyên của 7 chủng TKMX bất hoạt bằng phenol, tiêm dưới da nhắc lại nhiều lần với liều 10^8 VK/gà/lần tiêm. IgY tách chiết từ lòng đỏ trứng gà gây miễn dịch để ra có phản ứng đặc hiệu với cả 7 chủng TKMX gây miễn dịch qua thử nghiệm bằng phản ứng ELISA và ngưng kết VK với mức độ phản ứng khác nhau giữa các chủng VK.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đình Bảng, Nguyễn Thái Sơn. Mức nhạy cảm với một số loại kháng sinh của một số loài VK gây nhiễm khuẩn bệnh viện. Một số công trình nghiên cứu về độ nhạy cảm của VK với thuốc kháng sinh. Viện Thông tin Y học TW. Hà Nội. 1992, tr.110-113.
2. Lê Thu Hồng. Nghiên cứu chế tạo huyết tương kháng TKMX đa giá, tinh chế và đánh giá hiệu quả điều trị của chế phẩm trên động vật và bệnh nhân bỏng. Luận án Tiến sỹ khoa học Y Dược. Hà Nội. 2004.
3. Đỗ Minh Trung, Hoàng Trung Kiên, Lê Văn Đông. Nghiên cứu tách chiết, tinh sạch kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng gà. Tạp chí Thông tin y dược. Số chuyên đề Miễn dịch học. 2010, tr.77-81.
4. Lê Thế Trung, Hoàng Ngọc Hiến và CS. Nghiên cứu các týp huyết thanh, yếu tố dịch tễ học gây nhiễm khuẩn bỏng do TKMX và đề xuất các týp VK dự tuyển để chế tạo vắc xin. Đề tài nghiên cứu cấp Bộ Y tế. Hà Nội. 1999.
5. Ko K.Y, Ahn D.U. Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. Department of Animal Science. Iowa State University. Ames 50011.
6. Kovacs-Nolan J, Mine Y. Passive immunization through avian egg antibodies. Food Biotechnol. 2004, 18, pp.39-62.
7. Nilsson E, Amini A, Wretling B, Larsson A. *Pseudomonas aeruginosa* infections are prevented in cystic fibrosis patients by avian antibodies binding *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007, Sep 1, 856 (1 - 2), pp.75-80.
8. Nilsson E, Larsson A, Olesen H.V, Wejåker P.E, Kollberg H. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. Pediatr Pulmonol. 2008, Sep, 43 (9), pp.892-899.
9. Woolley J.A. Landon J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. J Immunol Methods. 1995, 178 (2), pp.253-265.