

# TÁC DỤNG IN VIVO CỦA KHÁNG THỂ IgY KHÁNG TRỰC KHUẨN MỦ XANH TRÊN VẾT THƯƠNG BỎNG THỰC NGHIỆM NHIỄM TRỰC KHUẨN MỦ XANH

*Tim Sunnary\**; *Đỗ Minh Trung\*\**

*Lê Thu Hồng\*\*\**; *Lê Văn Đông\*\**

## TÓM TẮT

Đề tài này được tiến hành nhằm đánh giá tác dụng in vivo của kháng thể IgY kháng trực khuẩn mủ xanh (TKMX) tách chiết từ lòng đỏ trứng gà gây miễn dịch với vi khuẩn (VK) trên vết bỏng thực nghiệm nhiễm TKMX. Tạo vết bỏng nhiệt cho thỏ với đường kính 3 cm và độ sâu toàn bộ da ở hai bên sống lưng. Gây nhiễm TKMX vết bỏng với mật độ 0,5 ml hỗn dịch  $\times 10^8$  VK/vết bỏng. Ngày thứ hai sau gây nhiễm VK, khi vết bỏng có biểu hiện nhiễm TKMX rõ rệt, điều trị vết thương bằng thay băng đắp gạc tẩm kháng thể IgY kháng TKMX nồng độ 1,0 mg/ml hoặc gạc tẩm nước muối sinh lý. Kết quả cho thấy: vết thương điều trị bằng kháng thể IgY kháng TKMX có mật độ VK TKMX/cm<sup>2</sup> bề mặt vết thương giảm dần, có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị và so với nhóm chứng từ ngày thứ 6 sau điều trị. Như vậy, IgY kháng TKMX có tác dụng kháng khuẩn đặc hiệu đối với vết thương bỏng nhiễm TKMX trên thực nghiệm.

\* Từ khóa: Bỏng thực nghiệm; Kháng thể IgY; Trực khuẩn mủ xanh.

## IN VIVO EFFECT OF ANTI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IgY ANTIBODY ON EXPERIMENTAL BURN WOUNDS INFECTED WITH *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

### SUMMARY

*This research aims to evaluate the in vivo effect of anti- P.aeruginosa IgY antibody extracted from the yolk of P.aeruginosa hyper-immunized hens on the experimental burn wounds infected with P.aeruginosa. Full-thickness thermal burn wounds with the size of 3cm in diameters were created along the back of rabbits. The wounds were then infected with P.aeruginosa at the dose of 0.5 ml  $\times 10^8$  bacteria per wound. On the second day post infection, when the infections were well established, the wounds were treated by bandage changes together either with locally applied anti- P.aeruginosa IgY preparation at 1.0 mg/ml or saline. The results showed that the amount of bacteria detected on the surface of wounds reduced significantly from day 6<sup>th</sup> post-treatment in the IgY treated group in comparison with pre-treatment and control group. The obtained results indicating specific anti- P.aeruginosa in vivo on experimental burn wounds of the IgY preparation.*

\* Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; Experimental burn; IgY antibody.

---

\* Lưu học sinh Campuchia

\*\* Học viện Quân y

\*\*\* Bệnh viện 103

Phán biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Thái Sơn

**ĐẶT VẤN ĐỀ**

Nhiễm khuẩn vết thương do TKMX đã và 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 có dấu hiệu TKMX kháng nhiều loại kháng sinh, đòi hỏi cần có các biện pháp điều trị hiệu quả hơn như trị liệu miễn dịch sử dụng huyết thanh kháng TKMX [4, 7, 9]. Đã có một số nghiên cứu chế tạo huyết thanh kháng TKMX bằng phương pháp gây miễn dịch cho ngựa với kháng nguyên là VK TKMX và chế tạo thành chế phẩm kháng thể dùng để tắm đắp và rửa vết thương, vết bỏng [1, 3]. 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 và quy trình sản xuất phức tạp.

Loài gà có khả năng sinh kháng thể IgY đặc hiệu với mầm bệnh. Kháng thể đặc hiệu từ máu gà mái được chuyển qua và tích tụ trong lòng đỏ trứng. Để sản xuất IgY đặc hiệu, chỉ cần gây miễn dịch cho gà mái và thu hoạch trứng là có kháng thể. Công nghệ này đơn giản, có khả năng cho sản lượng kháng thể lớn với giá thành thấp [5, 6]. Nhiều nước trên thế giới đã chế tạo kháng thể IgY kháng một số mầm bệnh khác nhau như TKMX và VK, virut gây bệnh đường ruột ở người và gia súc. Trong số này, Bộ Y tế Thụy Điển đã cho phép sử dụng IgY kháng TKMX để bổ sung vào nước xúc hống dự phòng nhiễm TKMX đường hô hấp cho bệnh nhân bị chứng xơ nang phổi [8].

Tiếp nối với nghiên cứu trước của chúng tôi đã thành công trong việc gây miễn dịch cho gà mái đẻ trứng với hỗn hợp 7 chủng TKMX thuộc 5 týp huyết thanh thường gặp ở Việt Nam, sau đó tách chiết tinh sạch kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng gà gây miễn dịch tạo chế phẩm có phản ứng gây ngưng kết in vitro với các chủng TKMX đã gây miễn dịch [2]. Đề tài này được tiến hành nhằm: *Đánh giá tác dụng in vivo của chế phẩm IgY kháng TKMX ở vết thương bỏng nhiễm TKMX trên động vật thực nghiệm.*

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu.

\* *Động vật thí nghiệm*: 16 thỏ đực, cân nặng trung bình  $2,0 \pm 0,2$  kg/con. Thỏ đực nuôi trong điều kiện vệ sinh sạch sẽ, đầy đủ thức ăn, nước uống và chiếu sáng tự nhiên tại Trung tâm Nghiên cứu Sinh-Y-Dược học Quân sự, Học viện Quân y trong suốt thời gian tiến hành thí nghiệm.

\* *Vi khuẩn*: chủng TKMX mã số 6P11, có độc lực thuộc týp huyết thanh P11, phân lập từ vết bỏng, 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. Đây là chủng có hoạt tính ngưng kết mạnh nhất với kháng thể IgY kháng TKMX [2].

\* *IgY kháng TKMX*: kháng thể IgY kháng TKMX được chế tạo và tách chiết từ lòng đỏ trứng gà, là sản phẩm được mô tả trong nghiên cứu trước của chúng tôi [2]. Tiêu chuẩn hóa sản phẩm cuối cùng bằng các chỉ tiêu vô trùng, nồng độ protein, tính đặc

hiệu với kháng nguyên TKMX qua xét nghiệm ELISA và hoạt tính gây ngưng kết TKMX trên in vitro. Đựng sản phẩm trong lọ thủy tinh nút kín, dán nhãn và bảo quản liên tục ở 4°C cho đến khi sử dụng.

\* *Các hóa chất khác*: thạch nutrient agar, thạch máu và thạch Mac-con key, nước muối sinh lý (NMSL) vô trùng, phiến nhựa (đục lỗ kích thước 1 x 1 cm) vô trùng, tấm bông vô trùng.

## 2. Phương pháp nghiên cứu.

\* *Gây bông thử thực nghiệm*:

Cạo sạch lông 2 bên sống lưng thỏ với kích thước vùng cạo lông khoảng 12 cm mỗi chiều. Cố định thỏ lên bàn chuyên dụng, gây mê bằng dung dịch penthotal 1% với liều 1 ml/kg cân nặng theo đường tiêm tĩnh mạch tai. Khi thỏ đã mê, dùng bình nhôm hình trụ đáy phẳng có đường kính 3 cm đựng nước đang sôi với thể tích hằng định, đặt lên vùng da thỏ đã cạo lông và ép với một lực không đổi, bằng cách đặt một quả cân 1 kg lên miệng bình. Thời gian tiếp xúc với nguồn nhiệt 35 giây, tạo vết bông đường kính 3 cm với độ bông sâu toàn bộ lớp da. Băng kín vết thương bằng gạc vô trùng.

\* *Gây nhiễm khuẩn vết bông*:

Nuôi cấy hoạt hóa và tạo sinh khối TKMX chủng 6P11 trong môi trường thạch dinh dưỡng ở 37°C trong 24 giờ. Thu hoạch, rửa và hòa loãng khuẩn lạc trong NMSL vô trùng tạo mật độ  $10^8$  VK/ml bằng phương pháp so độ đục Mc-Faland. Sử dụng dung dịch VK này gây nhiễm cho vết thương ngày thứ hai sau gây bông với liều 0,5 ml (tương ứng với  $0,5 \text{ ml} \times 10^8$  VK TKMX/vết thương, bằng cách nhỏ trực tiếp dung dịch vi khuẩn lên

vết bông, để 30 phút, sau đó băng kín vết thương bằng gạc vô trùng tẩm vaselin.

\* *Điều trị vết bông nhiễm TKMX*:

Vào ngày thứ 2 sau gây nhiễm TKMX (ngày thứ 3 sau gây bông), trên lưng mỗi thỏ có 2 vết thương kích thước tương tự nhau được gây nhiễm TKMX với liều lượng và phương pháp như nhau với biểu hiện vết thương có màu xanh đặc trưng do nhiễm TKMX. Lấy mẫu để định lượng mật độ VK ở vết thương, sau đó điều trị theo quy ước, vết thương bên phải làm nhóm nghiên cứu và vết thương bên trái làm đối chứng âm. Hàng ngày, thay băng vết thương, sau đó nhóm nghiên cứu đắp gạc tẩm 5 ml dung dịch IgY kháng TKMX nồng độ 1,0 mg/ml pha trong NMSL, nhóm chứng đắp gạc tẩm 5 ml NMSL. Băng bên ngoài vết thương bằng gạc vô trùng tẩm vaselin để giữ độ ẩm cho vết thương.

\* *Xác định số lượng VK trên  $1 \text{ cm}^2$  diện tích vết bông*:

Dùng tấm bông vô trùng lấy bệnh phẩm trên  $1 \text{ cm}^2$  vết bông, sau đó hòa loãng bệnh phẩm trong 2 ml NMSL 9‰ vô trùng. Dùng loope định lượng 10  $\mu\text{l}$  bệnh phẩm đã hòa loãng lên đĩa thạch nutrient agar, thạch máu, Mac - Conkey. Ủ ấm 37°C/24 giờ. Định loại VK theo thường quy xét nghiệm vi sinh vật để xác định số lượng VK có trong mẫu xét nghiệm. Tính số lượng VK/cm<sup>2</sup> diện tích vết bông theo công thức:

$$\text{Số lượng VK/cm}^2 = N \times 2 \times 10^2$$

Trong đó: N là số lượng 1 loại khuẩn lạc đếm được; 2: số ml NMSL 9‰ vô trùng.

Xác định số lượng VK trên 1 cm<sup>2</sup> diện tích vết bỏng ở cùng một vị trí lấy mẫu tại 5 thời điểm: trước gây nhiễm TKMX (ngày thứ 2 sau gây bỏng), ngày thứ 2 sau gây nhiễm TKMX (ngày thứ 3 sau gây bỏng), định kỳ sau 3 ngày điều trị tương ứng với các ngày thứ 6, 9 và 12 sau gây bỏng.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

### 1. Gây nhiễm TKMX lên vết thương bỏng.

Trước gây nhiễm, không có vết bỏng nào có TKMX mọc, chứng tỏ điều kiện gây bỏng thực nghiệm không có tạp lẫn TKMX vào vết thương bỏng. Sau gây nhiễm 24 giờ với mật độ 0,5 ml x 10<sup>8</sup> VK/vết bỏng, 32/32 (100%) vết bỏng đều có TKMX phát triển. Tuy nhiên, mật độ TKMX ở một số vết thương thấp dưới 2 x 10<sup>7</sup> VK/cm<sup>2</sup>. Những thỏ có ít nhất 1 vết thương với mật độ TKMX dưới 2 x 10<sup>7</sup> VK/cm<sup>2</sup> loại ra khỏi nhóm nghiên cứu, kết quả chỉ còn 13 thỏ với 26 vết thương gây nhiễm đạt yêu cầu với mật độ trung bình (1,79 ± 1,43) x 10<sup>9</sup>/cm<sup>2</sup> bề mặt vết bỏng. Tỷ lệ gây nhiễm thành công TKMX lên vết bỏng đạt 13/16 thỏ (81%). Khả năng gây nhiễm thành công TKMX lên vết bỏng phụ thuộc vào một số yếu tố, trong đó, điều kiện độ ẩm của vết thương đóng vai trò quan trọng. Trong nghiên cứu này, các trường hợp gây nhiễm không đạt chủ yếu ở giai đoạn đầu nghiên cứu, có

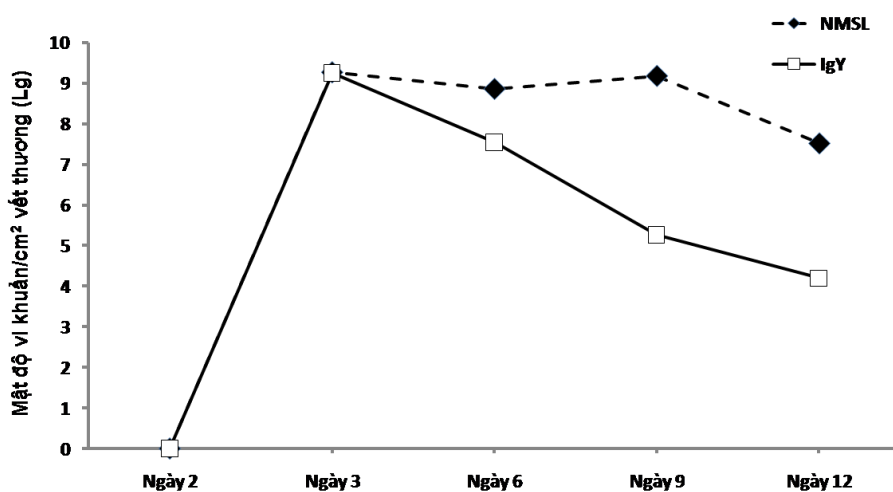
băng vết thương, nhưng thiếu áo choàng mặc lên mình thỏ để bảo vệ vết thương tránh cọ sát, làm di lệch băng, dẫn đến khô vết thương. Có thể điều này ảnh hưởng đến khả năng tăng sinh của VK sau gây nhiễm vết thương. Vì thế, trong gây nhiễm vết thương, cần áp dụng các biện pháp băng vết thương với gạc tẩm vaseline để giữ ẩm nhưng vẫn phải có các biện pháp cố định và che đậy vết thương để hạn chế tác dụng không mong muốn do phản ứng tự nhiên của súc vật.

### 2. Kết quả về VK trên vết bỏng gây nhiễm TKMX trước và sau điều trị.

Mật độ trung bình của TKMX ở vết bỏng trước điều trị bằng chế phẩm IgY là (1,76 ± 1,67) x 10<sup>9</sup>/cm<sup>2</sup> và trước điều trị bằng NMSL là (1,82 ± 1,22) x 10<sup>9</sup>/cm<sup>2</sup>, tương đương nhau (p > 0,05). Sau điều trị bằng thay băng và tẩm đắp kháng thể IgY kháng TKMX, mật độ TKMX ở vết thương có xu hướng giảm dần và giảm rõ rệt sau 6 ngày. Đến ngày thứ 9, một số vết thương không còn TKMX mọc, đây cũng là thời điểm một số vết thương biểu mô hóa kín và liền hoàn toàn (*bảng 1*). Ở nhóm đối chứng, vết thương được thay băng và tẩm đắp NMSL, mật độ TKMX cũng có xu hướng giảm dần. Tuy nhiên, tốc độ giảm chậm hơn. Điều này cho thấy, chế phẩm IgY có tác dụng ức chế TKMX trên vết bỏng thực nghiệm nhiễm TKMX.

*Bảng 1:* Tỷ lệ % các loài VK phân lập trên vết bỏng thỏ nhiễm TKMX chủng 6P11 (với liều gây nhiễm 0,5 x 10<sup>8</sup> VK/ml).

THỜI ĐIỂM LẤY MÁU (ngày thứ)	VẾT THƯƠNG ĐỐI CHỨNG (n = 13)			VẾT THƯƠNG ĐIỀU TRỊ BẰNG IgY (n = 13)		
	Loài VK	Tỷ lệ nhiễm	Mật độ/cm <sup>2</sup>	Loài VK	Tỷ lệ nhiễm	Mật độ/cm <sup>2</sup>
2	<i>P. aeruginosa</i>	0/13	0	<i>P. aeruginosa</i>	0/13	0
	<i>S. aureus</i>	10/13	< 10 <sup>4</sup>	<i>S. aureus</i>	7/13	< 10 <sup>4</sup>
3	<i>P. aeruginosa</i>	13/13	(1,82 ± 1,22) x 10 <sup>9</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	13/13	(1,76 ± 1,67) x 10 <sup>9</sup>
	<i>S. aureus</i>	8/13	< 10 <sup>4</sup>	<i>S. aureus</i>	6/13	< 10 <sup>4</sup>
	<i>S. epidermides</i>	1/13	< 10 <sup>4</sup>	<i>S. epidermides</i>	2/13	< 10 <sup>4</sup>
6	<i>P. aeruginosa</i>	13/13	(7,22 ± 8,95) x 10 <sup>8</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	13/13	(3,45 ± 7,37) x 10 <sup>9</sup>
	<i>S. aureus</i>	7/13	< 10 <sup>4</sup>	<i>S. aureus</i>	6/13	< 10 <sup>4</sup>
	<i>S. epidermides</i>	1/13	< 10 <sup>4</sup>	<i>S. epidermides</i>	2/13	< 10 <sup>4</sup>
9	<i>P. aeruginosa</i>	13/13	(1,50 ± 5,33) x 10 <sup>9</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	13/13	(1,80 ± 5,49) x 10 <sup>5</sup>
	<i>S. aureus</i>	6/13	< 10 <sup>4</sup>	<i>S. aureus</i>	6/13	< 10 <sup>4</sup>
	<i>S. epidermides</i>	1/13	< 10 <sup>4</sup>	<i>S. epidermides</i>	2/13	< 10 <sup>4</sup>
12	<i>P. aeruginosa</i>	11/13	(3,24 ± 7,45) x 10 <sup>7</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	5/13	(1,55 ± 5,54) x 10 <sup>4</sup>
	<i>S. aureus</i>	4/13	< 10 <sup>4</sup>	<i>S. aureus</i>	5/13	< 10 <sup>4</sup>
	<i>S. epidermides</i>	2/13	< 10 <sup>4</sup>	<i>S. epidermides</i>	8/13	< 10 <sup>4</sup>



Hình 1: Biến động mật độ TKMX ở vết bỏng trước và sau điều trị.

### 3. Chủng loại và mật độ VK khác ở vết bỏng.

Vào ngày thứ hai sau gây bỏng, ngay trước khi gây nhiễm TKMX, 17/26 (65%) vết thương có tụ cầu vàng (*S. aureus*) mọc. Kết quả xét nghiệm 1 ngày sau gây nhiễm TKMX, 18/26 vết thương có tụ cầu vàng mọc, đồng thời có thêm 3/26 vết thương có tụ cầu trắng (*S. epidermidis*) mọc. Tuy nhiên, mật độ của các loài VK này đều thấp dưới  $10^4$  VK/cm<sup>2</sup> diện tích vết bỏng. Kết quả xét nghiệm các ngày 6, 9 và 12 sau điều trị vẫn thấy vết thương có 2 loại VK này mọc. Mặc dù mật độ của VK vẫn duy trì ở mức độ thấp (dưới  $10^4$  VK/cm<sup>2</sup> bề mặt vết thương), nhưng VK xuất hiện đều cả ở vết thương được điều trị bằng kháng thể IgY kháng TKMX và điều trị bằng nước muối. Điều này cho thấy, kháng thể IgY kháng TKMX không có tác dụng lên loài VK này. Trong điều kiện thực nghiệm trên thỏ, mặc dù biện pháp sát trùng và băng vết thương được thực hiện, nhưng vết bỏng vẫn nhiễm một lượng tạp khuẩn nhất định. Hiện tượng này có thể do phản ứng tự nhiên của động vật là cọ vết thương vào thành chuồng, làm xô dịch băng che phủ vết thương, dẫn đến vết thương bị nhiễm. Tuy nhiên, mật độ VK vẫn duy trì ở mức độ thấp và có xu hướng giảm dần, chứng tỏ khả năng đề kháng tự nhiên của động vật khá tốt, khiến cho VK được khống chế không tăng sinh.

## KẾT LUẬN

Chế phẩm kháng thể IgY tách chiết, tinh sạch từ lòng đỏ trứng gà khi sử dụng để điều trị vết bỏng thỏ gây nhiễm TKMX thực nghiệm có khả năng ức chế sự phát triển của TKMX. Mật độ TKMX ở bề mặt vết bỏng giảm dần và mất hẳn sau 10 ngày điều trị bằng IgY, đồng thời vết bỏng thỏ điều trị bằng IgY cũng hình thành tổ chức hạt và biểu mô hóa nhanh sau ngày thứ 10.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 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 sĩ Khoa học Y Dược. Hà Nội. 2004.
2. Tim Sunnary, Đỗ Minh Trung, Lê Thu Hồng, Lê Văn Đông. Nghiên cứu chế tạo kháng thể từ lòng đỏ trứng gà kháng TKMX bằng phương pháp gây miễn dịch cho gà mái đẻ trứng. Tạp chí Y-Dược học quân sự. 2011, số 5, tr.119-124.
3. 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.
4. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. Clin Microbiol Rev. 2006. 19, pp.403-434.
5. Dias da Silva W, Tambourgi DV. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. Vet Immunol Immunopathol. 2010, 135 (3-4), pp.173-80.
6. Kovacs-Nolan, J.; Mine, Y. Passive immunization through avian egg antibodies. Food Biotechnol. 2004, 18, pp.39-62.
7. Mahar P, Padiglione AA, Cleland H, Paul E, Hinrichs M, Wasiak J. Pseudomonas aeruginosa bacteraemia in burns patients: Risk factors and outcomes. Burns. 2010, 36 (8), pp.1228-1233.
8. Nilsson E, Larsson A, Olesen HV, Wejåker PE, Kollberg H. Good effect of IgY against Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis patients. Pediatr Pulmonol. 2008, Sep, 43 (9), pp.892-829.
9. Tredget EE, Shankowsky HA, Rennie R, Burrell RE, Logsetty S. Pseudomonas infections in the thermally injured patients. Burns. 2004, 30, pp.3-26.