

NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG THỂ ĐA DÒNG VÀ BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG PHÁT HIỆN *Helicobacter pylori* TRONG MẪU HUYẾT THANH VÀ NƯỚC BỌT

Diệp Thế Tài^{1*}, Đỗ Hồng Phước¹, Lê Thị Tuyết Nga²,
Nguyễn Thị Phương Lan¹, Trần Ánh Tuyết³

¹Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh, *taithediệp@gmail.com

²Phòng khám đa khoa An Khang, Tổng công ty Sữa Việt Nam-Vinamilk

³Phòng khám quốc tế Yersin, công ty Đầu tư 3H

TÓM TẮT: Theo thống kê ở Việt Nam, mỗi năm có khoảng 15.000-20.000 người bị ung thư dạ dày, nguyên nhân gây bệnh chủ yếu do vi khuẩn *Helicobacter pylori*. Cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế (IARC) xếp vi khuẩn này vào nhóm I các tác nhân gây ung thư ở người dựa trên hai độc tố chính là *VacA* và *CagA*, trong đó, *CagA* (Cytotoxin-associated gene A) là một protein gây đáp ứng miễn dịch cao được mã hóa từ gen *cagA*, hiện diện trong khoảng 50-70% các chủng *H. pylori*, chiếm tỷ lệ rất cao trong ung thư dạ dày. Phát hiện nhanh chủng *H. pylori* mang *cagA* sẽ góp phần cảnh báo và định hướng điều trị. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích tạo ra kháng thể đa dòng phát hiện nhanh chủng *H. pylori* mang *cagA*. Để tạo kháng thể, protein *CagA* được sử dụng như kháng nguyên tiêm vào chuột nhắt cái màu trắng (Swiss), 6-8 tuần tuổi. Đáp ứng kháng thể được kiểm tra bằng phản ứng kết tủa khuếch tán kép trên thạch (Ouchterlony) và phương pháp ELISA gián tiếp. Giới hạn phát hiện và hiệu giá kháng thể được xác định bằng cách pha loãng bậc 2 kháng thể và kháng nguyên protein *CagA*. ELISA gián tiếp được dùng phát hiện *H. pylori* mang *cagA* trong mẫu nước bọt và huyết thanh. Liều gây đáp ứng miễn dịch thích hợp là 20 µg protein/con. Kháng thể thu được có ái lực cao với kháng nguyên, hiệu giá kháng thể kháng protein *CagA* là 51200 và thử nghiệm khả năng phản ứng của kháng thể thu được trên mẫu nước bọt và huyết thanh đạt kết quả khả quan.

Từ khóa: *Helicobacter pylori*, kháng thể đa dòng, tác nhân gây ung thư.

MỞ ĐẦU

Việt Nam là nước có tỷ lệ nhiễm *Helicobacter pylori* cao và có liên quan chặt chẽ với loét dạ dày-tá tràng, viêm teo niêm mạc và chuyển sản ruột. Nhiễm *H. pylori* trên những người nội soi dạ dày-tá tràng là 65,6%, ở nhóm người trên 40 tuổi là 71,4%, nhóm dưới 40 tuổi là 57,8% [6]. Theo kết quả xét nghiệm huyết thanh học, tỷ lệ lưu hành kháng thể kháng *H. pylori* ở nhóm người có bệnh dạ dày-tá tràng là 98,2%, ở nhóm người khỏe mạnh là 77,4% [1]. Ở trẻ em, tỷ lệ nhiễm *H. pylori* là khá cao và có liên quan đến viêm dạ dày, loét dạ dày-tá tràng. Phương pháp chẩn đoán mô bệnh học cho thấy tỷ lệ nhiễm *H. pylori* ở trẻ em viêm dạ dày chiếm 83,2%, còn ở trẻ bị loét dạ dày-tá tràng dương tính với CLOtest là 85,7% [7]. Tại Việt Nam, theo nghiên cứu của Tạ Long (2003) [5], tỷ lệ *CagA*-dương tính ở nhóm bệnh nhân loét dạ dày là 76,7% cao hơn so với nhóm viêm dạ dày là 46,7%. *CagA* là 1 protein gây đáp ứng miễn dịch cao có khối lượng phân tử 120 kDa và

được mã hóa bởi gen *cagA* thuộc tiêu đảo sinh bệnh *cag PAI*. Gen *cagA* hiện diện trên khoảng 50-60% các chủng *H. pylori* và là một chỉ điểm cho gây tổn thương tế bào và thường phối hợp với loét và ung thư dạ dày. Đây là một độc tố có tính kháng nguyên rất mạnh. Khi người bệnh nhiễm chủng *H. pylori* có sinh *CagA* sẽ nhanh chóng xuất hiện kháng thể kháng *CagA* [4]. Xu hướng hiện nay là tìm phương pháp chẩn đoán nhanh *H. pylori* mang *cagA* sẽ nhằm góp phần định hướng điều trị và ưu tiên phương pháp lấy mẫu ít xâm nhiễm. Do đó, đề tài được tiến hành nhằm tạo ra kháng thể đặc hiệu phát hiện nhanh *H. pylori* mang *cagA* và bước đầu sử dụng kháng thể tạo ra phát hiện *H. pylori* trong mẫu huyết thanh và nước bọt.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Động vật thí nghiệm là chuột nhắt cái màu trắng (Swiss), 6-8 tuần tuổi, cân nặng 18-22 g (do Viện Pasteur tp. Hồ Chí Minh cung cấp).

Kháng nguyên là protein *CagA* được biểu

hiện và tinh sạch từ chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 bằng IPTG từ nghiên cứu trước đây của phòng thí nghiệm của chúng tôi.

Mẫu bệnh phẩm là mẫu nước bọt được thu thập từ 30 bệnh nhân được chẩn đoán dương tính với *H. pylori* bằng các phương pháp: CLOtest và kỹ thuật PCR. Mẫu huyết thanh (15 mẫu) dương tính với *H. pylori* bằng kỹ thuật test nhanh của hãng MP diagnostics và kỹ thuật PCR tại viện Pasteur tp. Hồ Chí Minh.

Gây đáp ứng miễn dịch: protein CagA tái tổ hợp đã được tinh sạch được sử dụng để tiêm vào ổ bụng chuột cái Swiss 6-8 tuần tuổi. Khả năng gây đáp ứng miễn dịch của protein CagA được khảo sát với 3 hàm lượng: 10, 20 và 40 μ g. Chuột thí nghiệm được chia thành 3 lô tương ứng với 3 hàm lượng kháng nguyên và một lô đối chứng. Mỗi lô chuột gồm có 3 con, mỗi con được tiêm 0,2 ml dịch nhũ tương kháng nguyên, lô đối chứng được tiêm 0,2 ml dung dịch PBS 1X vô trùng. Trước khi gây đáp ứng miễn dịch, máu của chuột được kiểm tra để đảm bảo rằng các chuột không có sản xuất kháng thể kháng CagA trước đó. Trong thời gian gây miễn dịch, máu được lấy định kỳ để theo dõi đáp ứng miễn dịch của chuột. Các mẫu máu được thu nhận từ tĩnh mạch đuôi và sau đó được tách lấy huyết thanh. Quá trình gây đáp ứng miễn dịch gồm 4 lần tiêm, mỗi lần tiêm cách nhau 2 tuần.

Kiểm tra đáp ứng kháng thể: đáp ứng kháng thể được kiểm tra bằng phản ứng kết tủa khuếch tán kép trên thạch (Ouchterlony) [2] và phương pháp ELISA gián tiếp gồm các bước cố định kháng nguyên đã biết trước nồng độ, cho phản ứng với kháng thể kháng CagA (sản phẩm nghiên cứu) và phát hiện bằng phản ứng màu với cơ chất TMB (tetramethylbenzidine) thông qua kháng thể thứ cấp anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (hãng KPL), đo OD ở bước sóng 450/620 nm.

Xác định hiệu giá kháng thể và giới hạn phát hiện: giới hạn phát hiện và hiệu giá kháng thể được xác định bằng cách pha loãng kháng thể thành các nồng độ từ 1/100 đến 1/204800 và cho phản ứng với các kháng nguyên protein CagA được pha loãng bậc 2, từ 1 μ g/ml đến 10 μ g/ml, và phát hiện phản ứng giữa kháng nguyên, kháng thể bằng phản ứng màu với cơ

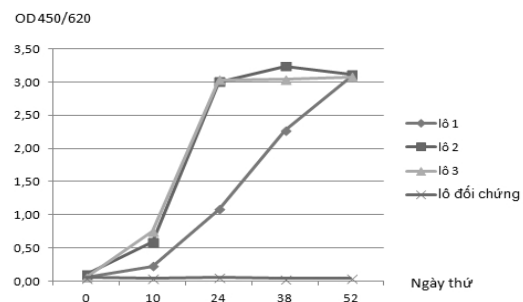
chất TMB thông qua kháng thể thứ cấp anti-mouse IgG-horseradish peroxidase, đo OD ở bước sóng 450/620 nm.

Phát hiện *H. pylori* trong mẫu huyết thanh, nước bọt: phát hiện *H. pylori* mang *cagA* trong mẫu nước bọt và huyết thanh được tiến hành bằng ELISA gián tiếp, quy trình tương tự như kiểm tra đáp ứng kháng thể đã nêu ở trên, tuy nhiên, kháng nguyên lúc này là mẫu huyết thanh hoặc nước bọt.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Gây đáp ứng trên chuột

Ở thời điểm trước khi tiêm, chuột không có hiện tượng đáp ứng miễn dịch. Đáp ứng miễn dịch của chuột tương ứng với hàm lượng kháng nguyên tiêm vào, 10 ngày sau khi tiêm mũi miễn dịch, chuột bắt đầu hình thành đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên. Sau đó, tiến hành tiêm mũi nhắc lại lần thứ nhất. Vào ngày thứ 24, có sự tăng nhanh khả năng đáp ứng trong huyết thanh so với lần tiêm đầu, đặc biệt là ở lô 2 và lô 3 (hình 1). Tiếp tục tiêm nhắc lại và lấy máu ở các ngày thứ 38 và 52, lúc này lượng kháng thể tạo ra khá nhiều và tương đối ổn định, đến ngày thứ 52, huyết thanh cả 3 chuột đều cho kết quả $OD_{450/620} > 3,000$. Nhờ có sự kích thích lặp lại của kháng nguyên trong các mũi tăng cường nên kháng thể được tạo ra nhanh chóng với số lượng lớn và một đặc trưng của đáp ứng thứ phát là có sự chuyển đổi lớp kháng thể từ IgM có ái lực thấp sang IgG có ái lực cao với kháng nguyên.



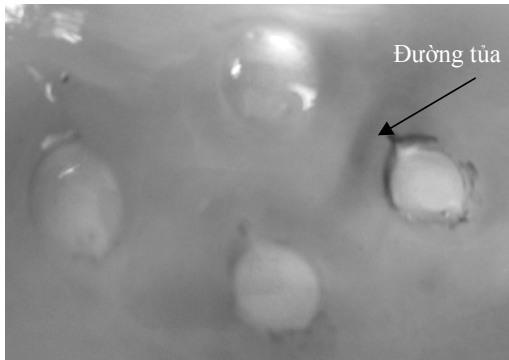
Hình 1. Quá trình gây đáp ứng trên chuột

Có sự khác biệt rõ ràng về mức độ đáp ứng miễn dịch giữa 3 lô chuột được tiêm kháng

nguyên và lô đối chứng (được tiêm dung dịch PBS 1X vô khuẩn). Khả năng đáp ứng miễn dịch của chuột ở lô 1, 2 và 3 có sự khác biệt. Chuột ở lô đối chứng không tạo kháng thể kháng protein CagA. Chuột ở lô 2 và lô 3 có đáp ứng mạnh hơn so với chuột ở lô 1. Trong đó, lô 2 có OD_{450/620} trung bình là 2,008, cao hơn so với lô 3 (OD_{450/620} trung bình=1,992). Tỷ số OD trung bình giữa lô 1 so với đối chứng cao gấp 25 lần, giữa lô 2 và lô đối chứng là 38,6 lần, giữa lô 3 và lô đối chứng là 38,3 lần. Như vậy, kháng thể tăng sau mỗi lần tiêm nhắc lại.

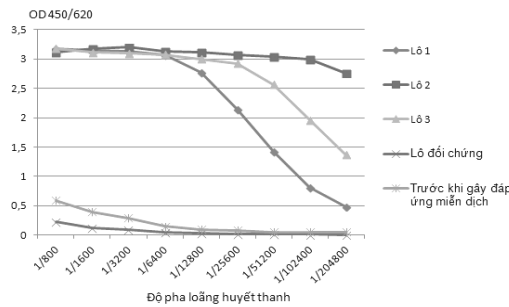
Đáp ứng kháng thể

Phản ứng kết tủa khuếch tán kép trên thạch:
 Xuất hiện một đường tủa giữa giếng kháng nguyên và giếng huyết thanh nồng độ 1, điều này chứng tỏ phản ứng kháng nguyên-kháng thể CagA đã có xảy ra.



Hình 2. Phản ứng kết tủa khuếch tán kép trên thạch

Phản ứng Elisa

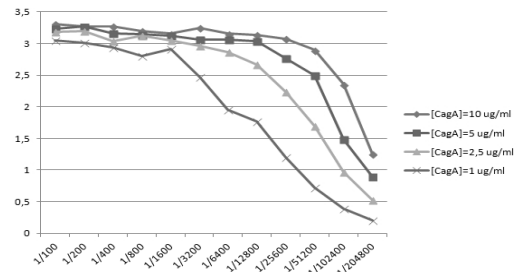


Hình 3. Kết quả đáp ứng của các lô chuột trước và sau khi gây đáp ứng miễn dịch

Chuột trước khi gây đáp ứng miễn dịch

hoàn toàn không sản xuất kháng thể kháng protein CagA. Huyết thanh của chuột ở lô 2 và 3 vẫn cho tín hiệu tương tác giữa kháng nguyên và kháng thể rõ ràng ở độ pha loãng 1/204800, trong đó, tỷ số khác biệt giữa kháng thể trên lô 1 và lô đối chứng là 48,6 lần, giữa lô 2 và lô đối chứng là 276,4 lần, giữa lô 3 và lô đối chứng là 137,2 lần. Như vậy, hiệu giá kháng thể của lô 2 cao hơn lô 3 và lô 1. Ở độ pha loãng 1/204800, vẫn phát hiện được sự tạo thành phức hợp kháng thể-kháng nguyên, vì thế, chúng tôi kết luận kháng thể tạo thành có ái lực cao với kháng nguyên.

Xác định hiệu giá kháng thể và giới hạn phát hiện



Hình 4. Xác định hiệu giá kháng thể và ngưỡng phát hiện

Kháng thể được tạo ra có thể phát hiện được *H. pylori* ở nồng độ 1 µg/ml, và mẫu có số lượng *H. pylori* cao (10 µg/ml) vẫn có thể phát hiện được. Như vậy, dãy phát hiện *H. pylori* đối với kháng thể được tạo ra khá rộng, trong khoảng nồng độ từ 1/6400 đến 1/204800, sự biến thiên của kháng thể khá tuyến tính. Tại độ pha loãng 1/51200, có sự khác biệt rõ ràng giữa kháng thể và lô đối chứng; ở nồng độ CagA là 10 µg/ml, tỷ lệ khác biệt giữa kháng thể và đối chứng là 30 lần; ở nồng độ 5 µg/ml, tỷ lệ khác biệt giữa kháng thể và đối chứng là 40 lần; ở nồng độ 2,5 µg/ml, tỷ lệ khác biệt giữa kháng thể và đối chứng là 39 lần; ở nồng độ 1 µg/ml, tỷ lệ khác biệt giữa kháng thể và đối chứng là 19 lần; ở độ pha loãng 1/51200, tín hiệu nền rất thấp, không ảnh hưởng đến kết quả của xét nghiệm. Sự khác biệt giữa phản ứng dương và âm rõ ràng, do đó, chúng tôi chọn hiệu giá kháng thể là 51200.

Phát hiện *H. pylori* trong mẫu huyết thanh, nước bọt

Thử nghiệm phát hiện *H. pylori* bằng kháng thể được tạo ra trên 2 loại mẫu: huyết thanh là loại mẫu rất khó phát hiện và khả năng phát hiện *H. pylori* tương đối thấp, theo Hatami et al. (2013) [3], trong tổng số 100 mẫu huyết thanh có 18% số mẫu có chứa gen *cagA*. Trong tổng số 15 mẫu dương tính *H. pylori* bằng test nhanh được kiểm tra trong nghiên cứu này, chỉ có 20% số ca có gen *cagA*. Đối với 30 mẫu nước bọt, là loại mẫu không xâm lấn đã có nhiều nghiên cứu phát hiện *H. pylori* bằng kỹ thuật PCR và nuôi cấy, tỷ lệ dương tính *cagA* với PCR là 83,33% (25/30). Sử dụng phương pháp ELISA với kháng thể được tạo ra để phát hiện kháng nguyên CagA có trong huyết thanh bệnh nhân, và so với huyết thanh âm (OD trung bình = 0,093), kết quả giữa ELISA và PCR có sự tương đồng cao. Đối với mẫu nước bọt, có sự tương đồng giữa mẫu dương tính bằng PCR và ELISA thực hiện với kháng thể của chúng tôi, tuy nhiên, trong đó có 2 mẫu có tỷ lệ chênh lệch huyết thanh là 10,84 và 15,4 nhưng PCR lại âm tính, điều này có thể lý giải do phản ứng chéo giữa kháng thể và các tạp chất trong nước bọt, vì vậy, dẫn đến kết quả không tương đồng như trên. Nghiên cứu nhằm hạn chế các tạp chất trong nước bọt ảnh hưởng đến kết quả ELISA vẫn đang được tiến hành. Như vậy, với kháng thể vừa tạo được, chúng tôi bước đầu chứng minh được khả năng phát hiện *H. pylori* mang *cagA* trong mẫu nước bọt và huyết thanh, tuy nhiên, chúng tôi đang tiếp tục tiến hành trên số lượng mẫu lớn hơn để tính độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thành công trong việc gây đáp ứng miễn dịch trên chuột với kháng nguyên protein CagA của *Helicobacter pylori* và xác

định liều tiêm thích hợp là 20 µg protein/con. Thu nhận được kháng huyết thanh đặc hiệu và xác định hiệu giá kháng thể kháng protein CagA là 51.200. Thử nghiệm khả năng phản ứng của kháng thể thu được trong mẫu nước bọt và huyết thanh đạt kết quả khả quan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phùng Đắc Cam, Nguyễn Thái Sơn, 2003. *Helicobacter pylori* và bệnh dạ dày-tá tràng, Nxb. Y học, Hà Nội.
2. Copper, Terrance G., 1977. The tools of Biochemistry. John Willey & Sons, New York, 256-307, 355-405.
3. Hatami S., Esmaeili D., Fallah J., Rezaee J., 2013. The presence of *cagA* genome in blood of infected patient with *Helicobacter pylori* as new marker. J. Bacteriol. Res., 5(4): 46-50.
4. Kusters J. G., A. H. van Vliet, Kuipers E. J., 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin. Microbiol. Rev., 19(3): 449-490.
5. Tạ Long, 2003. Bệnh lý dạ dày tá tràng và vi khuẩn *Helicobacter pylori*. Nxb. Y học, Hà Nội.
6. Tung L. N., Tomohisa U., Yoshiyuki T., Dung T. T., Long T., Bang H. M., Song H. L., Ky D. T., Dung D. H., Hai H. H., Takeshi M., Tadayoshi O., Masaaki K., Kazunari M., Toshio F., Yoshio Y., Masatsugu M., 2010. *Helicobacter pylori* infection and gastroduodenal diseases in Vietnam: a cross-sectional, hospital-based study. BMC Gastroenterol, 10:114.
7. Trần Thiện Trung, 2008. Bệnh dạ dày-tá tràng và nhiễm *Helicobacter pylori*. Xuất bản lần thứ hai. Nxb. Y học, tp. Hồ Chí Minh.

A STUDY ON THE DEVELOPMENT AND APPLICATIONS OF POLYCLONAL ANTIBODY FOR THE DETECTION OF *Helicobacter pylori* IN SERUM AND SALIVA

**Diep The Tai¹, Do Hong Phuoc¹, Le Thi Tuyet Nga²,
Nguyen Thi Phuong Lan¹, Tran Anh Tuyet³**

¹Pasteur Institute of Ho Chi Minh city

²An Khang clinic, Vinamilk corporation

³Yersin international clinic, Investment company 3H

SUMMARY

In Vietnam, it's annually estimated that there are 15,000-20,000 cases of gastric cancer, in which *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is the most interested agents and has been classified as a group I of carcinogens by the International Agency for Research on Cancer (IARC) based on two main toxins CagA and VacA. CagA (cytotoxin-associated gene A) encoded by the *cagA* gene is a protein that makes highly immune response and presents in 50-70% of *H. pylori* strains with a very high rate of gastric cancer. Rapid detection of *H. pylori* carrying *cagA* will contribute to warning and orienting for treatment. The aim of the study, therefore, is to produce and apply polyclonal antibodies for rapid detection of *H. pylori cagA*. Protein CagA was used as antigen inducing the immune response in white female mice (Swiss) at 6-8 weeks old. Indirect Elisa and Ouchterlony double immunodiffusion were performed to check antibody responses. The limit of detection and antibody titers were calculated by two fold dilution of antigen and antibody. Indirect Elisa was also used for detection of *H. pylori* carrying *cagA* in saliva and serum samples. The suitable immunogen dose was 20 µg protein/mouse. The titer of antibody was 51,200, and antibody affinity was high. Using antibody to detect *H. pylori* carrying *cagA* gene in saliva and serum samples got satisfying results.

Keywords: *Helicobacter pylori*, bacterial toxins, *cagA* toxins, polyclonal antibody.

Ngày nhận bài: 15-7-2013