

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT BỘ SINH PHẨM PHÁT HIỆN NHANH VIRUS H5N1 Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

Lê Hoàng Đức, Hoàng Hà, Phạm Thanh Tùng, Phạm Bích Ngọc, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà
Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Virus cúm A/H5N1 là một biến chủng của virus cúm gia cầm, chứa hệ gen RNA sợi đơn âm gồm 8 phân đoạn mã hóa cho 11 loại protein. Lớp vỏ protein của virus H5N1 có 2 protein quyết định tính kháng nguyên là hemagglutinin nhóm 5 (H5) và neuraminidase nhóm 1 (N1). Từ khi được phát hiện gây bệnh trên người lần đầu tiên vào năm 1997, đến nay virus H5N1 đã gây nên đại dịch cúm ở nhiều quốc gia trên thế giới trong đó có Việt Nam và gây ra thiệt hại nặng nề về kinh tế và con người. Do thời gian trung bình từ khi khởi phát bệnh cúm đến khi từ vong vào khoảng 9-10 ngày nên việc chẩn đoán, phát hiện nhanh và điều trị sớm là rất cần thiết để cứu sống các trường hợp nhiễm virus H5N1, cũng như ngăn ngừa dịch cúm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đưa ra kết quả nghiên cứu sản xuất bộ sinh phẩm phát hiện nhanh virus H5N1 dựa trên ngưng kết hạt latex ở quy mô phòng thí nghiệm, tạo tiền đề cho việc sản xuất bộ sinh phẩm này trên quy mô lớn phục vụ cho công tác chẩn đoán, phát hiện sớm và ngăn ngừa đại dịch cúm A/H5N1 tại Việt Nam.

Từ khóa: chẩn đoán nhanh, cúm gia cầm, H5N1, hạt latex, kháng thể đơn chuỗi.

MỞ ĐẦU

Cúm gia cầm do virus cúm A gây ra là một bệnh nhiễm trùng ở loài lông vũ. Virus cúm A được chia thành các phân nhóm dựa trên hai glycoprotein bề mặt là hemagglutinin và neuraminidase. HA được chia thành 16 phân nhóm (từ H1 đến H16) và NA được chia thành 9 phân nhóm (từ N1 đến N9). Trong số 16 phân nhóm của virus cúm A, có chúng trong phân nhóm H5 và H7 có thể gây ra thế cúm gia cầm độc lực cao, có khả năng lây lan mạnh, từ vong nhanh ở người loài lông vũ cúm nhiễm (Chen *et al.*, 2007). Hầu hết các virus cúm gia cầm có ảnh hưởng đến người thường gây ra các triệu chứng đường hô hấp nhẹ hoặc viêm kết mạc mắt, trừ một ngoại lệ là chủng H5N1 (http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_07_AI_Nov05_vietnamese.pdf). Virus H5N1 là thể độc lực cao (HPAI, highly pathogenic avian influenza) gây bệnh nặng với tỷ lệ tử vong cao ở người trong các vụ dịch diễn ra vào năm 1997, 2003. Theo số liệu của Tổ chức y tế thế giới (WHO), từ năm 2003 đến tháng 6 năm 2013 đã có 375 người tử vong do cúm gia cầm trong số 630 ca nhiễm H5N1 tại 15 nước. Tại Việt Nam, dịch cúm gia cầm do virus cúm A/H5N1 bắt đầu xuất hiện từ những tháng cuối năm 2003, đã có 62 ca tử vong trong số 125 người nhiễm cúm gia cầm. Đồng thời, bệnh cúm gia cầm cũng là nguyên nhân làm hàng chục triệu con gia cầm bị chết hoặc bị tiêu huỷ gây thiệt hại kinh tế nặng nề cho ngành chăn nuôi (http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20130604CumulativeNumberH5N1cases.pdf)

Hệ gen của virus cúm A/H5N1 có cấu trúc đặc trưng của hệ gen virus cúm A là RNA sợi đơn âm (ss(-)RNA) có độ dài tổng số khoảng 13.500 ribonucleotide, bao gồm 8 phân đoạn gen riêng biệt mã hóa cho 11 protein khác nhau của virus. Trong đó, tên gọi của virus H5N1 dựa trên 2 protein quyết định tính kháng nguyên là hemagglutinin nhóm 5 (H5) (Steinhaure, 1999) và neuraminidase nhóm 1 (N1) (Castrucci *et al.*, 1993).

Để ngăn ngừa nguy cơ bùng phát đại dịch cúm, việc chẩn đoán, phát hiện nhanh và điều trị sớm cho các trường hợp nhiễm virus H5N1 là rất cần thiết. Ở Việt Nam, hai kỹ thuật chủ yếu được sử dụng để chẩn đoán virus cúm A/H5N1 là kỹ thuật RT-PCR (PCR phiên mã ngược) và Real time PCR (PCR thời gian thực), tuy nhiên chỉ có một vài nơi có thể thực hiện được và quá trình thực hiện cũng mất nhiều thời gian. Do đó, việc chẩn đoán nhanh các trường hợp nghi nhiễm cúm A/H5N1 ở Việt Nam gặp rất nhiều khó khăn về mặt kỹ thuật. Hiện nay, dựa trên sự tồn tại của kháng nguyên bề mặt H5 (Chen *et al.*, 2007), người ta có thể xác định nhanh và chính xác sự có mặt của virus H5N1 bằng cách sử dụng kháng thể đơn chuỗi đặc hiệu với protein kháng nguyên này (Cheng *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005).

Trong công trình này, chúng tôi đã nghiên cứu và chế tạo thành công bộ kit latex phát hiện virus cúm A/H5N1 dựa trên nguồn kháng thể đơn chuỗi VH10 đặc hiệu H5 và kỹ thuật ngưng kết hạt latex.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Kháng thể đơn chuỗi VH10 đã được tinh sạch, do phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Hạt Latex có kích thước 1 µm, được cung cấp từ hãng Bangslab (<http://www.bangslabs.com>). Dịch niệu trứng gà chứa virus H5N1 với hiệu giá HA là 256 do phòng Vi sinh vật phân tử, Viện Công nghệ sinh học cung cấp. Các chủng virus H5N1, các mẫu bệnh chứa H5N1 do Trung tâm chẩn đoán Thú y Trung ương cung cấp.

Phương pháp

Gắn kháng thể VH10 vào hạt latex: Kháng thể VH10 được gắn vào các hạt latex theo quy trình của hãng Bangslab (<http://www.bangslabs.com>). Trước khi tiến hành gắn kháng thể VH10, hạt latex được rửa 4 lần bằng dung dịch đệm Poly Link Coupling Buffer. Sau đó, các hạt này sẽ được kích hoạt bằng cách trộn lẫn với 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC). Phần từ EDAC sẽ gắn tam thời lên nhóm chức -COOH trên bề mặt hạt latex để tạo ra một liên kết có độ linh động cao. Sau đó kháng thể VH10 với các lượng khác nhau (0,1 mg; 0,2 mg và 0,4 mg) sẽ

được trộn với 12,5 mg hạt latex. Khi đó nhóm amin bậc 1 của kháng thể VH10 đặc hiệu H5 sẽ liên kết với nhóm -COOH đã được kích hoạt bằng EDAC tạo ra hạt latex gắn kháng thể VH10.

Kiểm tra tính ngưng kết của tổ hợp hạt latex gắn kháng thể VH10 với kháng nguyên H5

Sử dụng nguyên lý ngưng kết đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể. Trong đó, hạt latex đóng vai trò giá đỡ làm cho các liên kết này trở nên ổn định hơn và phản ứng ngưng kết thực chất là phản ứng trùng hợp của các hạt latex có kích thước nhỏ. Kháng nguyên trong mẫu chẩn đoán đóng vai trò cầu nối các hạt này với nhau. Để quan sát được bằng mắt thường phản ứng ngưng kết giữa kháng thể trên bề mặt hạt latex và kháng nguyên bề mặt H5 thì vùng tua phải có trên 100 cụm tua, mỗi cụm tua có kích thước khoảng 50 µm và chứa khoảng 105 hạt latex, trong đó mỗi hạt latex phải có ít nhất 10 kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên H5 bám trên bề mặt (<http://www.bangslabs.com>). Hạt latex sau khi gắn kháng thể VH10 lên bề mặt sẽ được trộn với dung dịch chứa virus (hiệu giá HA là 256) được pha loãng ở các nồng độ khác nhau nhằm tìm mức độ ngưng kết của hạt latex.

Phương pháp sử dụng bộ kit ngưng kết latex phát hiện virus cúm A/H5N1

Bộ kit bao gồm các ống eppendorf có chứa dung dịch latex gắn kháng thể đơn chuỗi, pipet hút, lamên lam kính và giấy hướng dẫn sử dụng.

Trước khi làm xét nghiệm bảo quản kit thử ở 4°C. Khi làm xét nghiệm, thực hiện quy trình thực hiện gồm các bước:

Bước 1: Lấy kit thử ra khỏi túi kín đựng sản phẩm và sử dụng kit thử. Để đạt kết quả tốt nhất, toàn bộ quá trình xét nghiệm phải được hoàn thành trong vòng 4 giờ kể từ khi mở túi đựng sản phẩm và 48 giờ ở 4°C. Bước 2: Lấy lam kính và lamên ra khỏi bộ kit, kiểm tra độ sạch của dụng cụ. Bước 3: Nhỏ 10 µl dung dịch latex có gắn kháng thể đơn chuỗi lên bề mặt lam kính. Bước 4: Hút 10 µl dịch mẫu thu ngoài thực địa trộn đều với dung dịch hạt latex đã chuẩn bị trên lam kính. Bước 5: Quan sát kết quả bằng mắt thường. Bước 6: Nếu quan sát bằng mắt thường không thấy tua cần phải kiểm tra lại bằng soi kính hiển vi: Đặt nhẹ nhàng lamên lên bề mặt dụng dịch trộn. Bước 7: Quan sát dưới kính hiển vi và đọc kết quả.

Kiểm tra độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ kit latex ngoài thực địa

Kit chẩn đoán virus cúm A/H5N1 được kiểm tra khả năng phát hiện virus cúm A/H5N1 với các mẫu thu ngoài thực địa. Kết quả được so sánh với các phương pháp phát hiện virus cúm A/H5N1 khác như phương pháp chỉ có thể xảy ra khi số phân tử protein được gắn lên bề mặt hạt latex phải đủ lớn. Để có thể tìm được lượng kháng thể thích hợp nhất, chúng tôi tiến hành phản ứng gắn kháng thể đơn chuỗi lên bề mặt hạt latex với các lượng lần lượt 0,1 mg, 0,2 mg và 0,4 mg. Hạt latex sau khi đã gắn kháng thể lên bề mặt được trộn với kháng nguyên H5 của virus H5N1 đã được làm bất hoạt. Với hạt latex được gắn 0,1 mg kháng thể đơn chuỗi, rất khó quan sát thấy sự ngưng kết kháng nguyên kháng thể bằng mắt thường, chỉ dưới kính hiển vi 10x10 mới thấy hiện tượng ngưng kết xảy ra rải rác. Hiện tượng ngưng kết được quan sát rất rõ ràng bằng mắt thường khi trộn hạt latex đã gắn 0,2 mg; 0,4 mg VH10 với kháng nguyên H5. Tuy nhiên, khi gắn 0,4 mg VH10 lên bề mặt hạt latex thì phản ứng ngưng kết xảy ra rõ ràng và nhiều nhất. Do đó, lượng kháng thể VH10 thích hợp để gắn lên bề mặt hạt latex và sử dụng chúng trong chẩn đoán bệnh cúm A/H5N1 trên gia cầm là 0,4 mg.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Gắn kháng thể VH10 lên bề mặt hạt latex

Quá trình gắn kháng thể đơn chuỗi lên bề mặt hạt latex phụ thuộc rất nhiều yếu tố như dung dịch đệm, nồng độ và tính chất của protein, pH... Trong đó, lượng protein đóng một vai trò quan trọng vì khả năng ngưng kết chỉ có thể xảy ra khi số phân tử protein được gắn lên bề mặt hạt latex phải đủ lớn. Để có thể tìm được lượng kháng thể thích hợp nhất, chúng tôi tiến hành phản ứng gắn kháng thể đơn chuỗi lên bề mặt hạt latex với các lượng lần lượt 0,1 mg, 0,2 mg và 0,4 mg. Hạt latex sau khi đã gắn kháng thể lên bề mặt được trộn với kháng nguyên H5 của virus H5N1 đã được làm bất hoạt. Với hạt latex được gắn 0,1 mg kháng thể đơn chuỗi, rất khó quan sát thấy sự ngưng kết kháng nguyên kháng thể bằng mắt thường, chỉ dưới kính hiển vi 10x10 mới thấy hiện tượng ngưng kết xảy ra rải rác. Hiện tượng ngưng kết được quan sát rất rõ ràng bằng mắt thường khi trộn hạt latex đã gắn 0,2 mg; 0,4 mg VH10 với kháng nguyên H5. Tuy nhiên, khi gắn 0,4 mg VH10 lên bề mặt hạt latex thì phản ứng ngưng kết xảy ra rõ ràng và nhiều nhất. Do đó, lượng kháng thể VH10 thích hợp để gắn lên bề mặt hạt latex và sử dụng chúng trong chẩn đoán bệnh cúm A/H5N1 trên gia cầm là 0,4 mg.

Tính ngưng kết của hạt latex gắn VH10 với kháng nguyên H5

Tổ hợp hạt latex gắn kháng thể VH10 được trộn lẫn với dung dịch chứa virus được pha loãng ở các nồng độ 10 lần, 100 lần và 1000 lần để xác định mức độ ngưng kết của hạt latex. Chúng được so sánh với đối chứng âm là hạt latex được trộn lẫn với dung dịch PBS (Phosphate Buffer Solution).



Hình 1. Kết quả phản ứng ngưng kết soi dưới kính hiển vi có vật kính 10. (A: Hạt latex trộn với dung dịch PBS; B: Hạt latex trộn với dịch niêu 1000 gà hiệu giá HA là 256; C: Niêu trứng gà pha loãng 10 lần có hiệu giá HA 25.6; D: Niêu trứng gà pha loãng 100 lần có hiệu giá HA 2.56; E: Niêu trứng gà pha loãng 1000 lần có hiệu giá HA 0,256)

Thí nghiệm thứ nhất: với nồng độ gốc, không pha loãng (hiệu giá HA là 256/đơn vị), mức độ ngưng kết rất rõ ràng, có thể thấy được bằng mắt thường, còn khi quan sát bằng kính hiển vi có độ phóng đại 10 lần thì nhận thấy vùng ngưng kết là rất lớn và có mật độ dày đặc (Hình 1B).

Thí nghiệm thứ hai: dung dịch niệu trứng gà pha loãng 10 lần thì sau khoảng 2 đến 3 phút sự ngưng kết xuất hiện và mật độ các vùng ngưng kết có thưa hơn và diện tích cũng nhỏ hơn so với thí nghiệm thứ nhất. (Hình 1C)

Thí nghiệm thứ ba: dung dịch niệu trứng gà pha loãng 100 lần sau 2 đến 3 phút quan sát bằng mắt thường khó có thể nhận thấy được sự ngưng kết nên chúng tôi tiến hành soi dưới kính hiển vi thì thấy mật độ và diện tích vùng ngưng kết thưa hơn thí nghiệm thứ hai. (Hình 1D)

Thí nghiệm thứ tư: dung dịch niệu trứng gà được pha loãng 1000 lần, lúc này không thể quan sát được hiện tượng ngưng kết bằng mắt thường. Sau khi soi dưới kính hiển vi, mật độ ngưng kết và diện tích ngưng kết rất nhỏ. Do đó chúng tôi quyết định không pha loãng nữa. (Hình 1E)

Do đó, có thể ứng dụng phương pháp gắn hạt latex có gắn kháng thể VH10 trong phát hiện nhanh virus H5N1 ở nồng độ kháng thể thấp với hiệu quả HA là 256.

Kiểm tra sự hoạt động của bộ kit chẩn đoán virus cúm A/H5N1 được tạo ra

Bộ Kit latex được sử dụng cho việc phát hiện H5N1 được tạo thành có những thành phần sau: Ống đựng dung dịch latex loại 2 ml: 02 ống; Pipet hút: 01 chiếc; Dung dịch pha mẫu: 01 ống; Lam kính + lamet: 5 bộ; Giấy hướng dẫn sử dụng (Hình 2).



Hình 2. Bộ Kit latex chẩn đoán virus cúm A/H5N1

Khi làm xét nghiệm, người sử dụng chỉ cần nhỏ 10 µl dung dịch latex có gắn kháng thể đơn chuỗi lên bề mặt lam kính sau đó hút 10 µl dịch mẫu nghi nhiễm thu ngoài thực địa trộn đều với dung dịch hạt latex đã chuẩn bị trên lam kính và quan sát kết quả bằng mắt thường hoặc kính hiển vi. Nếu kết tủa xuất hiện, có thể quan sát bằng mắt thường sự co cụm của các hạt latex thành từng đám hoặc soi kính hiển vi có những đám kết tủa màu đen, thì chứng tỏ mẫu thu được có nhiễm virus cúm A/H5N1 (Hình 3). Nếu sau khi trộn 5 phút không thấy tủa xuất hiện, dung dịch trộn có màu trắng đồng đều của hạt latex và soi kính không thấy các đám tủa xuất hiện, chứng tỏ mẫu không chứa virus cúm A/H5N1 (Hình 4).



Hình 3. Kết quả quan sát bằng mắt thường. (A: Dung dịch latex đã gắn kháng thể không có virus; B, C, D, E: các mẫu bệnh có chứa virus có thể quan sát tủa bằng mắt thường.)

Kết quả ở hình 3 cho thấy, có thể nhận rõ các hạt latex bị co cụm tại các hình 3B, 3C, 3D, 3E và 3F. Sự co cụm ở các mức độ khác nhau.

Ở hình 4 là kết quả quan sát dưới kính hiển vi (độ phóng đại 40x) sự co cụm ở mức độ khác nhau của các hạt latex gắn kháng thể đơn chuỗi VH10 đặc hiệu với kháng nguyên H5.



Hình 4. Ảnh chụp hiển vi phản ứng kết tủa của dung dịch latex gắn kháng thể với dịch chứa kháng nguyên H5. A: Hạt latex có gắn kháng thể được trộn với dung dịch không chứa virus; B, C, D, E: kết quả ngưng kết giữa hạt latex gắn kháng thể với kháng nguyên H5 của virus cúm A/H5N1 với các hiệu quả khác nhau.

Thử nghiệm bộ kit latex với các mẫu thực địa

Với 20 mẫu thu được ngoài thực địa, gồm 8 mẫu dịch nghi nhiễm từ mô và não của gia cầm nhiễm bệnh (A1538, A1544, A1546, A1547, A1548, A1549, A1587, A1588) trong đó mẫu A1587 cho phản ứng âm tính với phản ứng Real time PCR 12 mẫu được thu từ dịch ngóaly hầu họng (A1562, A1563, A1564, A1565, A1566, N156, N157, N158, N160, V187, V544, V550) trong đó có 4 mẫu cho phản ứng âm tính với phản ứng Real time PCR là A1562, A1563, A1564, A1565. Kết quả thu được thể hiện ở Bảng 1.

Phản ứng ngưng kết được thực hiện với 20 mẫu, với các mẫu cho kết quả dương tính với phản ứng Real time PCR thì đều cho kết quả dương tính khi thử với kit latex. Đặc biệt các mẫu A1538, A1544, A1548, A1588, N157, N158, N160 cho

thấy các cụm tua rất rõ ràng khi soi lên kính hiển vi có độ phóng đại 10X10. Các mẫu có kết quả âm tính với phản ứng Real time PCR khi thử với bộ kit latex đều không phát hiện được cụm tua.

Bảng 1. Kết quả thử nghiệm bộ Kit latex phát hiện cúm gia cầm H5N1 với các mẫu thực địa

STT	Ký hiệu	Loại mẫu	Phương pháp Realtime PCR	Kit latex	Phương pháp HA
1	A1538	Homo	18,57	++	-
2	A1544	Homo	20,82	++	-
3	A1545	Homo	25,96	+	-
4	A1547	Homo	29,88	+	-
5	A1548	Homo	19,94	++	-
6	A1549	Homo	23,55	++	-
7	A1586	Homo	15,64	+	2
8	A1567	Homo	-	-	-
9	A1562	Swab	-	-	-
10	A1563	Swab	-	-	-
11	A1564	Swab	-	-	-
12	A1565	Swab	-	-	-
13	A1566	Swab	25,91	+	1
14	N156	Swab	25,17	+	2
15	N157	Swab	19,63	++	5
16	N158	Swab	20,07	++	5
17	N160	Swab	19,06	++	-
18	V187	Swab	26,12	+	1
19	V544	Swab	25,87	+	1
20	V550	Swab	24,62	+	-

Ghi chú: Các mẫu có số thứ tự từ 8 đến 12 là các mẫu âm tính khi kiểm tra bằng phản ứng Real time PCR. Ký hiệu (-) mẫu âm tính, (+) mẫu cho phản ứng dương tính, (++) mức độ ngưng kết cao có thể quan sát dễ dàng bằng kính hiển vi có độ phóng đại 10x10, Homo: Mẫu dịch nghiền não và phổi gia cầm nghi mắc cúm, Swab: Mẫu dịch ngoáy họng gia cầm nghi mắc cúm, đựng trong dung dịch bảo quản là PBS.

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy khả năng phát hiện virus với các mẫu thực địa của bộ kit latex cho kết quả tương tự với phương pháp Real time PCR, còn phương pháp ngưng kết HA kém hơn nhiều so với kit latex. Trong 15 mẫu dương tính phương pháp HA chỉ phát hiện được 7 mẫu bệnh. Có thể các mẫu thực địa có độ tinh sạch không cao còn lẫn nhiều tạp chất gây ảnh hưởng tới ngưng kết hồng cầu. Do đó có thể sử dụng kit latex cho các mẫu thu ngoài thực địa.

Kiểm tra độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ kit latex

Sử dụng 5 mẫu bệnh có nhiễm virus H5N1 trong đó có 2 mẫu thực địa và 3 mẫu dịch nước trứng. Kết quả ở bảng 2 cho thấy, với hai mẫu thực địa A1358 và A1544 bộ kit latex có khả năng phát hiện được virus H5N1 với hiệu giá là 1/64. Với mẫu dịch nước trứng A1433, bộ kit latex có khả năng phát hiện virus H5N1 với hiệu giá 1/256 và phát hiện được virus H5N1 với hiệu giá 1/1024 ở hai mẫu A1945 và A1457.

Bảng 2. Kết quả kiểm tra độ nhạy của kit latex với các hiệu giá khác nhau

STT	Ký hiệu	Loại mẫu	Phương pháp HA	Kit latex
1	A1538	Homo	-	1/64
2	A1544	Homo	-	1/64
3	A1945	A. fruit	1/1024	1/1024
4	A1457	A. fruit	1/32	1/1024
5	A1433	A. fruit	1/128	1/256

Ghi chú: Ký hiệu (-) mẫu âm tính, Homo: Mẫu dịch nghiền não và phổi gia cầm nghi mắc cúm, Swab: Mẫu dịch ngoáy họng gia cầm nghi mắc cúm, đựng trong dung dịch bảo quản là PBS

Phương pháp ngưng kết hồng cầu chỉ có khả năng phát hiện virus với hiệu giá là 1/128 ở mẫu nước trứng. Trong khi sử dụng kit latex với mẫu nước trứng (mẫu A1433, A1457) cho thấy độ nhạy của bộ kit: cao hơn so với phương pháp ngưng kết hồng cầu.

Độ đặc hiệu của bộ kit latex được kiểm tra với hai mẫu virus khác nhau là virus H9N2 và virus Newcastle. Trong đó, virus H9N2 thuộc nhóm Influenza A virus, gây bệnh cúm ở chim. Còn virus Newcastle thuộc nhóm Paramyxovirus gây bệnh dịch tả ở gà. Các triệu chứng bệnh do hai loại virus này gây nên giống với các triệu chứng bệnh cúm A/H5N1 trên gia cầm.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu của bộ kit Latex với hai chủng virus khác nhau

STT	Ký hiệu	Virus	Kit latex
1	1301	H9N2	-
2	1102	Newcastle	-

Ghi chú: Ký hiệu (-) mẫu âm tính

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, hai loại virus được dùng cho phản ứng ngưng kết latex đều cho kết quả âm tính. Do điều kiện để có được mẫu bệnh là khó khăn nên chúng tôi chỉ mới kiểm tra độ đặc hiệu của bộ kit latex được hai mẫu khác với virus cúm A/H5N1. Tuy nhiên, kết quả bước đầu cho thấy Kit latex chỉ ngưng kết đặc hiệu với virus cúm A/H5N1.

KẾT LUẬN

Đã ứng dụng thành công hạt latex có gắn kháng thể đơn chuỗi đặc hiệu cho kháng nguyên HA để phát hiện nhanh virus cúm A/H5N1 trong các mẫu nghiên cứu, đã chế tạo bộ kit phát hiện virus cúm A/H5N1 ở quy mô phòng thí nghiệm và thử nghiệm thành công trên thực địa. Bộ sinh phẩm có tính đặc hiệu, độ nhạy cao dễ dàng thực hiện ngoài thực địa. Đây sẽ là cơ sở để phát triển thành công nghệ chẩn đoán bệnh cúm A/H5N1 trên gia cầm.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam "Nghiên cứu chế tạo bộ sinh phẩm phát hiện nhanh virus cúm A ứng dụng kháng thể đơn chuỗi rFv tái tổ hợp". Các thí nghiệm được tiến hành có sự đồng ý của Phòng thí nghiệm trọng điểm về Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Castrucci MR, Kawakita Y (1993). Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *J Virol* 67(2): 759-764.
- Chen J, Jin M, Yu Z, Dan H, Zhang A, Song Y, Chen H (2007) A latex agglutination test for the rapid detection of avian influenza virus subtype H5N1 and its clinical application. *J Vet Diagn Invest* 19: 155-160.
- Cheng X, Zhang Y, Kotani N, Watanabe T, Lee S, Wang X, Kawashima I, Tai T, Taniguchi N, Honke K (2005). Production of a recombinant single-chain variable-fragment (scFv) antibody against sulfolipid. *J Biochem* 137(3):415-21.
- Steinhaure DA (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258(1): 1-20.
- World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2013. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20130604CumulativeNumberH5N1cases.pdf
- World Health Organization. Các vụ dịch cúm H5N1 độc lực cao ở gia cầm và ở người: Liên quan đến An toàn Thực phẩm, ngày 4/11/2005. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_07_AI_Nov05_vietnamese.pdf
- Xu X, Jin M, Yu Z, Li H, Qiu D, Tan Y, Chen H (2005). Latex Agglutination Test for Monitoring Antibodies to Avian Influenza Virus Subtype H5N1. *J Clin Microbiol* 43(4): 1953-1955.

DEVELOPMENT OF A DIAGNOSIS KIT FOR RAPID DETECTION OF H5N1 VIRUS IN THE LABORATORY

Le Hoang Duc*, Hoang Ha, Pham Thanh Tung, Pham Bích Ngọc, Le Van Sơn, Chu Hoang Ha
Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Influenza A/H5N1 virus is a subtype of avian influenza virus. The genome of influenza A/H5N1 virus consists of eight gene segments of negative-stranded RNA, which encode 11 viral proteins. Hemagglutinin (H5) and neuraminidase (N1) are two surface proteins of H5N1 virus, those function as targets of infectivity-neutralizing antibodies. In 1997, the avian influenza A virus subtype H5N1 crossed the avian-human species barrier for the first time. It has emerged as a highly fatal infectious disease in many countries including Vietnam. The estimated time between symptom onset and death is about 9-10 days. It is necessary to diagnose, detect the infection as well as control the outbreak of H5N1 virus at early stages. Here, we present the study on kit production, which is used for rapid detection of influenza A/H5N1 virus based on latex agglutination method. We also look at the initial step to produce this kit on a larger scale, in order to use it on diagnostic, rapid detection and control avian influenza in Vietnam.

Key words: Avian Influenza, H5N1, latex particle, rapid diagnosis, Single Chain Fragment Variable Antibodies.

*Author for correspondence: Tel: +84-4-37918003, e-mail: lh.duc@ibt.ac.vn