



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0020392

(51)⁷ **G01N 33/00, C12N 7/00**

(13) **B**

(21) 1-2016-02654

(22) 19.07.2016

(45) 25.02.2019 371

(43) 26.12.2016 345

(76) 1. **PHAN THỊ NGÀ (VN)**

Số nhà 23 Hàn Thuyên, phường Phạm Đình Hổ, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

2. **ĐẶNG ĐỨC ANH (VN)**

Số 1 Yecxanh, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

(54) **PHƯƠNG PHÁP TẠO KIT ĐỂ PHÁT HIỆN SỚM NHIỄM VIRUT DENGUE**

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp tạo kit để phát hiện sớm nhiễm virus dengue (MAC-ELISA) bao gồm các bước: (i) sản xuất hỗn hợp kháng nguyên dengue 4 typ; (ii) sản xuất cộng hợp; (iii) sản xuất huyết thanh chứng dương; (iv) sản xuất huyết thanh chứng âm; (v) sản xuất thanh nhựa 16 giếng gắn IgG dê kháng IgM người; (vi) sản xuất dung dịch PBS-T; (vii) sản xuất dung dịch pha loãng mẫu; (viii) sản xuất cơ chất; (ix) sản xuất dung dịch pha cơ chất; và (x) sản xuất dung dịch dùng phản ứng. Phương pháp theo sáng chế đã tạo ra được kit 2 x 8 xét nghiệm để thuận tiện sử dụng trong thực tế, đặc biệt có giá thành phù hợp trong điều kiện kinh tế ở Việt Nam.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến phương pháp tạo kit dùng để phát hiện sớm nhiễm virus dengue từ huyết thanh hoặc huyết tương (plasma) người.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sốt xuất huyết dengue là bệnh do muỗi *Aedes* truyền virus, hàng năm trên thế giới, ước tính có khoảng 2,5 tỷ người có nguy cơ nhiễm bệnh, trong đó khoảng 975 triệu người đang sống ở các khu vực đô thị ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới ở Đông Nam Á, Thái Bình Dương và châu Mỹ La Tinh.

Phát hiện nhanh và sớm mới nhiễm virus dengue rất có ý nghĩa để định hướng cho điều trị cũng như dự phòng bệnh được kịp thời. Có một số loại kit được sử dụng để phát hiện sớm nhiễm virus dengue, có loại kit đang thương mại hiện nay được sử dụng để phát hiện sớm nhiễm virus dengue từ huyết thanh người bằng kỹ thuật chuẩn thức MAC-ELISA (phát hiện IgM kháng virus dengue theo nguyên lý Capture), hoặc bằng kỹ thuật chưa chuẩn thức như kỹ thuật ELISA gián tiếp phát hiện IgM kháng virus dengue từ huyết thanh hoặc plasma của bệnh nhân. Ý tưởng chế tạo được kit có thể phát hiện sớm nhiễm virus dengue (phát hiện được IgM kháng virus dengue) không những từ huyết thanh mà còn từ plasma để có thể thực hiện xét nghiệm sớm ngay sau khi lấy mẫu là rất cần thiết.

Việc phát triển kit dùng để xét nghiệm phát hiện sớm nhiễm virus dengue dựa trên cơ sở kỹ thuật ELISA tóm bắt kháng thể IgM đặc hiệu kháng virus dengue có trong huyết thanh hoặc plasma của người sau nhiễm virus, đây là kháng thể liên quan đến sự mới nhiễm virus.

Virut dengue có 4 typ virut, đặc điểm kháng nguyên giữa các typ virut có sự khác biệt nên giữa các typ virut dengue miễn dịch không có khả năng bảo vệ chéo; Vì vậy một người sống trong vùng lưu hành dịch trong đời có thể sẽ bị nhiễm một lần hoặc lần lượt với cả 4 typ virut trong những thời gian khác nhau. Sau nhiễm virut dengue, đáp ứng miễn dịch sau nhiễm tiên phát và thứ phát cũng khác nhau. Thông thường sau nhiễm tiên phát, IgM đặc hiệu kháng virut dengue xuất hiện sớm với hiệu giá cao, còn trong trường hợp nhiễm thứ phát, IgM đặc hiệu kháng virut dengue cũng xuất hiện sớm, nhưng hiệu giá kháng thể rất thấp so so nhiễm tiên phát. Nên kit dùng để phát hiện IgM đặc hiệu kháng virut dengue cần phải có độ nhạy rất cao để đảm bảo có thể phát hiện được tối đa các trường hợp mới nhiễm virut dengue đặc biệt trong những trường hợp nhiễm thứ cấp.

Bản chất của kỹ thuật sáng chế

Mục đích của sáng chế là phải tăng được độ nhạy của kit phát hiện IgM đặc hiệu kháng virut dengue, để đạt được mục đích này, dựa vào nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch ELISA, việc tăng độ nhạy của kit sẽ phụ thuộc vào hai yếu tố chính đó là kháng nguyên và cộng hợp.

Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp tạo kit để phát hiện sớm nhiễm virut dengue (MAC-ELISA) bao gồm các bước: (i) sản xuất hỗn hợp kháng nguyên dengue 4 typ; (ii) sản xuất cộng hợp; (iii) sản xuất huyết thanh chứng dương; (iv) sản xuất huyết thanh chứng âm; (v) sản xuất thanh nhựa 16 giếng gắn IgG dê kháng IgM người; (vi) sản xuất dung dịch PBS-T; (vii) sản xuất dung dịch pha loãng mẫu; (viii) sản xuất cơ chất; (ix) sản xuất dung dịch pha cơ chất; và (x) sản xuất dung dịch dùng phản ứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong sáng chế này, kháng nguyên dengue sử dụng trong kit là kháng nguyên dengue hỗn hợp của 04 typ virut được sản xuất theo phương pháp sử dụng protamin sulfat có cải biên để tăng độ tinh khiết của kháng nguyên và giảm giá thành, thay vì chỉ sử dụng đại diện kháng nguyên tái tổ hợp của virut dengue

typ 2, hoặc sử dụng hỗn hợp kháng nguyên dengue 4 typ được sản xuất bằng phương pháp sử dụng sucroze axeton sẽ làm cho giá thành của kit cao hơn. Khi sản xuất kháng nguyên nếu chỉ sử dụng đại diện 1 typ virus dengue, độ nhạy của kit chẩn đoán sẽ không cao khi so sánh với kháng nguyên là hỗn hợp dengue 4 typ toàn tế bào, sẽ làm tăng độ nhạy của kỹ thuật ELISA

Phương pháp sản xuất kháng nguyên theo phương pháp sử dụng protamin sulfat sẽ sử dụng protamin sulfat 1,2% để loại bỏ các thành phần của não chuột.

Độ nhạy và đặc hiệu của kỹ thuật ELISA phát hiện IgM kháng virus dengue cũng liên quan mật thiết với cộng hợp gắn enzym. Cộng hợp sử dụng trong kỹ thuật ELISA phát hiện IgM kháng virus dengue có thể được chế tạo từ IgG tách chiết từ huyết thanh người nhiễm virus dengue gắn enzym. Thực tế cho thấy, có được huyết thanh người đã nhiễm đủ với 4 typ huyết thanh dengue là rất khó và nguồn nguyên liệu này không có tính bền vững cho mục đích sản xuất kit để thương mại. Ý tưởng sử dụng một kháng thể đơn dòng kháng dengue cũng có nhiều lựa chọn, có thể sử dụng kháng thể tái tổ hợp kháng dengue 12D hoặc kháng thể đơn dòng MAB 6b6c, đặc hiệu cả với 4 typ virus dengue để tạo cộng hợp. Thực tế cho thấy sử dụng kháng thể tái tổ hợp để tạo cộng hợp, hiệu giá cộng hợp không ổn định theo thời gian (giảm hiệu giá nhanh). Việc lựa chọn kháng thể đơn dòng MAB 6b6c là phù hợp. Tuy nhiên, phương pháp tạo cộng hợp gắn enzym của Wilson M.B và Nakane P. K năm 1978 là áp dụng để tạo cộng hợp cho cả phân tử IgG. Còn đối với kháng thể đơn dòng kháng virus dengue mã số thương mại MAB 6b6c là loại kháng thể đã cắt bớt một phần phân tử IgG chỉ lưu giữ mảnh Fc đặc hiệu. Nên kỹ thuật tạo cộng hợp với loại kháng thể đơn dòng này cũng đã được nghiên cứu cải biên.

Ngoài 2 thành phần liên quan đến độ nhạy và đặc hiệu của kit phát hiện IgM kháng virus dengue, một bộ kit hoàn chỉnh còn cần thêm các mẫu chứng, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa giữa các bước của phản ứng, dung dịch cơ chất hiện màu và dung dịch dừng phản ứng.

Các thành phần này cũng cần được tính toán pha chế chia theo đơn vị kit từ công thức sản xuất một lô thành phẩm.

Phương pháp theo sáng chế được tiến hành như sau:

i) Sản xuất hỗn hợp kháng nguyên dengue 4 typ

Tiêm hỗn dịch virus dengue vào não chuột ở 1–3 ngày tuổi (gây nhiễm riêng rẽ từng typ virus). Liều lượng tiêm là 0,01ml–0,02ml. Sau 96 giờ, chuột ốm liệt, gặt não chuột bằng máy hút chân không (số lượng chuột của từng typ virus tương tự như nhau). Nghiền đồng nhất hỗn hợp não chuột nhiễm virus dengue 4 typ trong PBS pH 8 tạo hỗn dịch 20% bằng máy nghiền Nissei, Nhật Bản 5000 vòng/phút trong 7 phút. Ly tâm 4.000 vòng/phút trong 60 phút ở 2–8°C, loại bỏ cặn. Sử dụng protamin sulfat 1,2% để loại bỏ các thành phần của não chuột, để ở 2–8°C trong 60 phút. Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 60 phút ở 2–8°C thu nước nổi. Bất hoạt kháng nguyên virus bằng formalin 0,006% để 2–8°C qua đêm. Đông khô kháng nguyên. Kiểm tra lại hiệu giá sau đông khô theo các tiêu chí kỹ thuật. Khi đạt yêu cầu, dán nhãn, bảo quản kháng nguyên ở - 20°C trong thời gian 5-10 năm.

ii) Sản xuất cộng hợp

Hoạt hóa kháng thể đơn dòng kháng virus dengue có ký hiệu MAB 6b6c. Tiếp đến, hoạt hóa enzyme HRPO [HRPO do Sigma sản xuất, mã số sản xuất P8375 (Peroxidase from Horseradish - HRPO)] bằng 0,1M NaIO₄. Gắn enzyme HRPO và kháng thể đơn dòng đã hoạt hóa để tạo cộng hợp. Tủa kháng thể gắn cộng hợp bằng amonisulfat bão hòa để loại enzyme HRPO thừa không gắn vào kháng thể. Làm đồng nhất cộng hợp trong dung dịch PBS (-) pH 7,2. Thẩm tích qua đêm trong dung dịch PBS (-) pH 7,2. Thu cộng hợp, bổ sung BSA, làm đồng nhất cộng hợp. Chuẩn độ theo phương pháp bán cờ bằng kỹ thuật ELISA để xác định hiệu giá. Kết quả xác định hiệu giá của cộng hợp là 10.000. Chia cộng hợp ra các tuýp, dán nhãn để -70°C sử dụng dần. Khi sản xuất kit cộng hợp được làm đồng nhất trong Proclin300 để có cộng hợp đặc 1.000 lần, chia ra các lọ theo đơn vị từng kit. Dán nhãn, bảo quản - 20°C.

iii) Sản xuất huyết thanh chứng dương

Chọn mẫu huyết thanh bệnh nhân sốt xuất huyết dengue hiệu giá kháng thể được xác định bằng kỹ thuật ELISA từng mẫu huyết thanh riêng có giá trị mật độ quang học (Optical density) $OD > 0,600$. Bất hoạt ở $56^{\circ}\text{C}/60$ phút để bất hoạt các tác nhân virus tiềm tàng khác nếu có trong mẫu. Chia ra các lọ mỗi lọ có chứa $10\mu\text{l}$ huyết thanh chứng dương. Dán nhãn, bảo quản ở -20°C .

iv) Sản xuất huyết thanh chứng âm

Huyết thanh người lành không có IgM kháng virus dengue, đã được xác định bằng kỹ thuật ELISA có giá trị mật độ quang học (Optical density) $OD < 0,200$. Bất hoạt ở $56^{\circ}\text{C}/30$ phút. Chia ra các lọ mỗi lọ có chứa $10\mu\text{l}$ huyết thanh chứng âm. Dán nhãn, bảo quản ở -20°C .

v) Sản xuất thanh nhựa 16 giếng gắn IgG dê kháng IgM người

Sử dụng kháng thể dê gắn trên thanh nhựa 2×8 giếng là IgG dê kháng IgM người chuỗi μ của hãng Cappel. Chuẩn độ hiệu giá kháng thể gắn trên thanh nhựa theo phương pháp bàn cờ bằng kỹ thuật ELISA, xác định hiệu giá kháng thể thích hợp để gắn trên thanh nhựa ở độ pha loãng $1/500$. Pha kháng thể theo hiệu giá đã chuẩn độ là $1/500$ bằng dung dịch natri cacbonat pH 9,6; Để ở $2-8^{\circ}\text{C}$ trong 30 phút để kháng thể hoàn toàn đồng nhất trong dung dịch natri cacbonat pH 9,6. Phủ thanh nhựa 2×8 (hãng NUNC của Đan Mạch): Cho mỗi giếng là $100\mu\text{l}$ dung dịch phủ bản có kháng thể IgG kháng IgM người/giếng, để $2-8^{\circ}\text{C}$ qua đêm. Lấp chỗ trống trên bề mặt giếng bằng $100\mu\text{l}$ dung dịch PBS (-) có 0,5% BSA cho một giếng. Rửa thanh nhựa bằng dung dịch PBS. Đóng gói trong giấy bạc, dán nhãn. Bảo quản tủ -20°C .

vi) Sản xuất dung dịch PBS-T

dung dịch PBS-T được pha theo công thức sau:

Pha dung dịch PBS (-) pH 7,2 đặc 10 lần theo công thức:

Thành phần	Nhà sản xuất	Khối lượng (tính cho 10.000ml)
NaCl	MERCK	800g
KCl	MERCK	20g
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	MERCK	282g
KH ₂ PO ₄	MERCK	20g
Nước cất 1 lần		vừa đủ 1000 ml

Dung dịch sau khi pha xong được sấy vô trùng, kiểm tra đạt pH 7,2; Thêm TWEEN 20 tỷ lệ 5‰ để làm đồng nhất trong dung dịch PBS (-) đặc 10 lần ít nhất là 24 giờ. Chia lọ 25ml/ lọ, dung dịch PBS – T x 10, trong suốt, không màu, lắc lên có bọt. Dán nhãn, bảo quản dung dịch PBS-T, bảo quản ở 2°C - 8°C.

vii) Sản xuất dung dịch pha loãng mẫu

Dung dịch pha loãng mẫu được sản xuất theo công thức sau:

Pha dung dịch PBS (-) pH 7,2 theo công thức

Thành phần	Nhà sản xuất	Số lượng (tính cho 1000ml)
NaCl	MERCK	80,0g
KCl	MERCK	2,0g
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	MERCK	28,2g
KH ₂ PO ₄	MERCK	2,0g
Nước cất lần		vừa đủ 1000ml

Dung dịch PBS (-) được sấy vô trùng, thêm đỏ phenol 0,2% (tỷ lệ 1%), kiểm tra pH 7,2. Lấy mẫu kiểm tra bằng kỹ thuật ELISA về các tiêu chuẩn kỹ thuật; Chia lọ 20ml/lọ, dung dịch pha loãng có màu đỏ nhạt, trong suốt; Dán nhãn, bảo quản ở 2 - 8°C.

viii) Sản xuất cơ chất

Dung dịch cơ chất tetramethylbenzidin (TMB) do hãng KPL Hoa Kỳ sản xuất và cung ứng, Cat.: 50-76-02. Chia lọ 1ml/lọ bằng pipet. Nhận dạng dung dịch cơ chất TMB, không màu. Dán nhãn, bảo quản ở 2 - 8°C.

ix) Sản xuất dung dịch pha cơ chất

Dung dịch pha cơ chất TMB do hãng KPL Hoa Kỳ sản xuất và cung ứng, Cat.: 50-76-02. Chia lọ 1ml/lọ bằng pipet. Nhận dạng dung dịch pha cơ chất TMB, không màu. Dán nhãn, bảo quản ở 4°C.

x) Sản xuất dung dịch dừng phản ứng

Dung dịch dừng phản ứng được sản xuất theo công thức sau:

Thành phần	Hãng sản xuất	Số lượng (100ml)
H ₂ SO ₄ .4N	MERCK	10,6ml
Nước cất		vừa đủ 100ml

Sau khi pha xong chia lọ: 2ml/lọ, dung dịch dừng phản ứng trong suốt, không màu. Lấy mẫu, kiểm tra bằng kỹ thuật MAC – ELISA theo các tiêu chuẩn kỹ thuật. Dán nhãn sản phẩm, bảo quản ở 2- 8°C.

Chuẩn độ các thành phần sinh phẩm và hoá chất nêu trên bằng kỹ thuật ELISA theo phương pháp bàn cờ để xác định nồng độ sinh phẩm sử dụng phù hợp và tối ưu nhất cho kỹ thuật, chia ra theo đơn vị kit để đóng gói: Cụ thể từng thành phần sinh phẩm được pha loãng bậc hai để xác định hiệu giá tối ưu dùng cho kỹ thuật ELISA, sau đó kiểm tra tổng thể các thành phần sinh phẩm đã chia ra theo đơn vị kit, yêu cầu phải đạt tiêu chuẩn kỹ thuật ELISA như quy chuẩn chung của kỹ thuật ELISA, sau đó mới đóng gói thành phẩm của kit.

Đóng gói các thành phần của kit kèm theo hướng dẫn sử dụng kit

Các thành phần của kit bao gồm các sinh phẩm, dung dịch và hoá chất khác cần thiết cho kỹ thuật ELISA được pha chế, đóng gói theo đơn vị bộ kit đủ cho 16 xét nghiệm bao gồm các thành phần cụ thể sau:

Thành phần bộ sinh phẩm	Số lượng
1. Thanh nhựa đáy bằng 2x8 giếng gắn kháng thể kháng IgM người đặc hiệu chuỗi μ	1 thanh
2. Kháng nguyên hỗn hợp dengue 4 typ đông khô	1 lọ (100 μ l)
3. Chứng dương: Huyết thanh người có IgM kháng virus dengue	1 lọ (10 μ l)
4. Chứng âm: Huyết thanh người không có IgM và IgG kháng virus dengue	1 lọ (10 μ l)
5. Cộng hợp: Kháng virus dengue gắn enzym Peroxydase	1 lọ (5 μ l)
6. Cơ chất TMB	1 lọ (1ml)
7. Dung dịch pha cơ chất có chứa Hydrogenperoxide	1 lọ (1ml)
8. PBS- T (x 10)	1 lọ (25ml)
9. Dung dịch pha loãng	1 lọ (12ml)
10. Dung dịch dừng phản ứng	1 lọ (2ml)

Đóng gói 5 thành phần sinh phẩm bao gồm: Kháng nguyên hỗn hợp dengue 4 typ, huyết thanh chứng dương, chứng âm, cộng hợp, thanh nhựa gắn kháng thể với số lượng một gói có chứa một loại thành phần sinh phẩm này; 5 thành phần này được đóng gói trong túi ni-lon, dán nhãn, bảo quản ở - 20°C.

Đóng gói 5 thành phần dung dịch và hoá chất bao gồm: Dung dịch pha loãng, dung dịch PBS-Tx10, dung dịch pha cơ chất, cơ chất, dung dịch dừng phản ứng, 5 thành phần này được đóng gói trong túi ni-lon, dán nhãn, bảo quản ở 2 - 8°C.

Các thành phần của kit cần thiết cho kỹ thuật MAC – ELISA được đóng gói và bảo quản theo như hướng dẫn để đảm bảo độ ổn định của kit trong khoảng thời gian là 2 năm.

Cách thức sử dụng kit: Khi sử dụng kit cần đọc kỹ hướng dẫn sử dụng; Đây là kit dùng để phát hiện sớm nhiễm virus dengue qua chỉ số phát hiện IgM kháng virus dengue từ huyết thanh hoặc plasma bệnh nhân bị sốt xuất huyết dengue.

Tất cả các hoá chất và sinh phẩm phải được chuẩn bị trước khi sử dụng 10 phút. Sau khi đã pha loãng, tất cả sinh phẩm nên được sử dụng trong vòng 24 tiếng.

Pha loãng dung dịch rửa PBS –T x 10

Dung dịch PBS -T đặc 10 lần, cho nước cất vừa đủ 250ml để rửa bản nhựa.

Pha loãng chứng âm và chứng dương 1: 100

- Cho vào mỗi lọ chứng dương và chứng âm 1ml dung dịch pha loãng.
- Lắc đều, giữ ở 2-8°C hoặc trên khay đá lạnh.

Pha loãng mẫu cần xét nghiệm (một kit sử dụng để xét nghiệm cho 5 mẫu bệnh phẩm, trừ các mẫu chứng):

Công thức pha mẫu bệnh phẩm:

- Huyết thanh (HT) bệnh nhân pha loãng với tỷ lệ 1/ 100:

10µl HT + 990µl dung dịch pha loãng

- Plasma bệnh nhân pha loãng với tỷ lệ 1/100:

10 µl Plasma + 990µl dung dịch pha loãng

Cho mẫu vào thanh nhựa

- Để thanh nhựa ở nhiệt độ phòng xét nghiệm để cân bằng nhiệt, rửa thanh nhựa 1 lần bằng dung dịch PBS-T.
- Cho vào mỗi giếng 100µl lần lượt mẫu chứng dương, chứng âm, dung dịch pha loãng (Blank), mẫu xét nghiệm theo như sơ đồ (mẫu chứng cần làm kép).

A	B	C	D	E	F	G	H
Chứng dương		Chứng âm		Blank		Mẫu 1	Mẫu 2
Mẫu 3	Mẫu 4	Mẫu 5	Mẫu 6	Mẫu 7	Mẫu 8	Mẫu 9	Mẫu 10

- Ủ mẫu ở nhiệt độ phòng trong vòng 1 giờ.
- Rửa thanh nhựa, có thể tiến hành rửa bằng máy rửa tự động hoặc bằng tay. Trước hết loại bỏ phần mẫu có trong các giếng vào một bình chứa chất thải, sau đó rửa thanh nhựa bằng dung dịch PBS- T: Cho dung dịch rửa (PBS -T) vào đầy các giếng ($\geq 300\mu\text{l}$) để khoảng 1 phút, đổ dung dịch rửa. Làm nhắc lại 3 lần.

Bổ sung kháng nguyên

- Pha loãng kháng nguyên: Cho 1ml dung dịch pha loãng vào lọ kháng nguyên.

- Lắc nhẹ đều, giữ lạnh trên khay đá (tránh tạo bọt).
- Cho 50 μl kháng nguyên đã pha loãng vào mỗi giếng.

Lưu ý: Có thể ủ nhiệt độ phòng trong 1 giờ hoặc ủ ở 2-8°C qua đêm.

- Rửa thanh nhựa bằng dung dịch PBS- T: Cho dung dịch rửa (PBS -T) vào đầy các giếng ($\geq 300\mu\text{l}$) để khoảng 1 phút, đổ dung dịch rửa. Làm nhắc lại 3 lần.

Bổ sung cộng hợp

- Cho 1ml dung dịch pha loãng vào lọ cộng hợp.
- Lắc đều, giữ lạnh trên khay đá.
- Cho 50 μl cộng hợp đã pha loãng vào các giếng.
- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.
- Rửa thanh nhựa bằng dung dịch PBS-T: Cho dung dịch rửa (PBS-T) vào đầy các giếng ($\geq 300\mu\text{l}$) để khoảng 1 phút, đổ dung dịch rửa. Làm nhắc lại 5 lần.

Bổ sung cơ chất

- Pha dung dịch cơ chất: Chỉ chuẩn bị trước khi cho vào phản ứng. Cho 1ml dung dịch pha cơ chất vào 1ml dung dịch TMB lắc kỹ (chú ý tránh ánh sáng).
- Cho vào mỗi giếng 100 μl dung dịch cơ chất.
- Ủ ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

- Nếu thấy có sự chuyển màu rõ ở các giếng mẫu chứng dương, trước khi có sự thay đổi màu ở các giếng mẫu chứng âm cần dừng phản ứng ngay; Hoặc sau 7-10 phút kiểm tra sự chuyển màu của các giếng mẫu chứng dương và mẫu chứng âm để dừng phản ứng.

Dừng phản ứng

Bằng cách cho vào mỗi giếng 100 μ l dung dịch H₂SO₄.4N.

Cách đọc kết quả xét nghiệm

Đọc kết quả: Ngay sau khi dừng phản ứng, đọc kết quả bằng máy đọc ELISA bằng bước sóng kép 450nm/620nm.

Tiêu chuẩn nhận định kết quả:

Giá trị ngưỡng là 2, với điều kiện các chứng:

OD blank, OD chứng âm $\leq 0,200$.

OD chứng dương / OD chứng âm ≥ 2 .

Với điều kiện sự chênh lệch về kết quả OD của 2 giếng cho các mẫu chứng không được quá 10 % (CV* < 10 khẳng định sự lặp lại kết quả xét nghiệm theo tiêu chí nội kiểm soát chất lượng xét nghiệm).

**CV từ viết tắt của tiếng Anh có nghĩa là Coefficient of variation, được dùng để kiểm soát độ chính xác của kết quả xét nghiệm bằng kỹ thuật ELISA theo tiêu chuẩn quốc tế, yêu cầu CV < 10 % (Cooper G. 2008).*

Các mẫu xét nghiệm dương tính khi:

OD mẫu xét nghiệm / OD chứng âm ≥ 2

Các mẫu xét nghiệm âm tính khi:

OD mẫu xét nghiệm / OD chứng âm < 2

Kit ELISA phát hiện IgM kháng virus dengue loại 16 xét nghiệm được tạo ra bằng phương pháp theo sáng chế là loại bộ sinh phẩm rất thuận lợi và kinh tế khi sử dụng. Đây là điểm mới và sự khác biệt của sáng chế này so với các tác

giả khác trong và ngoài nước vì cho đến nay chưa có công bố nào liên quan đến nghiên cứu của sáng chế này trong lĩnh vực xét nghiệm sốt xuất huyết dengue đối với loại bộ sinh phẩm cho xét nghiệm miễn dịch ELISA. Đây là cơ sở để kit ELISA phát hiện IgM kháng virus dengue được đưa ra để ứng dụng ở các phòng xét nghiệm của bệnh viện, các phòng xét nghiệm tuyến tỉnh, tuyến huyện trong chiến lược phát hiện sớm những trường hợp mắc sốt xuất huyết dengue để có thể dự phòng bệnh được kịp thời.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phương pháp tạo kit ELISA dùng để phát hiện IgM kháng virus dengue (Quy mô từ 300 kit đến 1000 kit tùy đơn đặt hàng nếu có)

1) Sản xuất từng thành phần của kit và chia nhỏ lượng sinh phẩm, hoá chất, dung dịch theo đơn vị kit/16 xét nghiệm, cụ thể:

a) Sản xuất kháng nguyên virus dengue 4 typ

- Gây nhiễm virus dengue các typ trên chuột bằng các chủng virus dengue typ 1, typ 2, typ 3 và typ 4. Nguồn chủng do CDC Fort Collins, Hoa Kỳ cung cấp. Liều lượng tiêm vào não chuột 0,01 ml – 0,02 ml/ con (tổng số 160 con cho 1 typ virus x 4 loại typ virus khác nhau)

- Thu chuột ốm liệt sau 96 giờ.

- Gắt não chuột bằng máy hút chân không.

- Nghiền não chuột 20% trong PBS pH 8 bằng máy nghiền Nissei-Nhật Bản tốc độ 5.000 vòng/phút trong 5 phút, thu được 440 ml.

- Ly tâm 4.000 vòng/phút x 60 phút ở 4°C bằng máy ly tâm Jouan MR1812.

- Loại bỏ cặn, thu được 320 ml.

- Sử dụng protamin sulfat 1,2% để loại bỏ các thành phần của não chuột, để ở 4°C/1 giờ.

- Ly tâm 10.000 vòng/phút/60 phút ở 4°C thu nước nổi.

- Bất hoạt kháng nguyên virus bằng formalin 0,006 % qua đêm.

- Chuẩn độ hiệu giá kháng nguyên sử dụng cho bộ sinh phẩm MAC – ELISA, lượng kháng nguyên cho đủ một bộ sinh phẩm là 100 µl/ lọ. Chia vào các lọ nhỏ.
- Đông khô kháng nguyên, kiểm tra lại hiệu giá sau đông khô theo các tiêu chí kỹ thuật miễn dịch ELISA

- Dán nhãn, bảo quản kháng nguyên ở tủ - 20°C.

* Điều kiện để thực hiện kỹ thuật phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp II, thực hiện kỹ thuật trong điều kiện nhiệt độ phòng khoảng 20°C-30°C.

b) Sản xuất cộng hợp gắn enzym

- Hoạt hóa kháng thể đơn dòng kháng virus trong nhóm Flavi do CDC Fort Collins cung cấp, mã số thương mại MAB 6b6c.
- Hoạt hoá enzym HRPO bằng 0,1 M NaIO₄ [HRPO do Sigma sản xuất, mã số sản xuất P8375 (Peroxidase from Horseradish - HRPO)].
- Gắn enzym HRPO và kháng thể đơn dòng kháng các virus nhóm Flavi đã hoạt hoá để tạo cộng hợp
- Tủa kháng thể gắn cộng hợp bằng amoniasulfat bão hoà để loại enzym HRPO thừa không gắn vào kháng thể, thu tủa.
- Làm đồng nhất cộng hợp trong dung dịch PBS (-) pH 7,2.
- Thẩm tích qua đêm trong dung dịch PBS (-) pH 7,2.
- Thu cộng hợp
- Cho 40 mg BSA, làm đồng nhất cộng hợp.
- Chuẩn độ bằng phương pháp bàn cờ để xác định hiệu giá cho kỹ thuật ELISA.
- Dựa trên kết quả xác định hiệu giá của cộng hợp, chia cộng hợp ra các tuýp ở dạng stock 0,2 ml/tuýp, dán nhãn để - 80°C sử dụng dần.
- Khi ra lọ, lấy cộng hợp stock ra làm đồng nhất trong dung dịch BSA 1% để tạo thành cộng hợp đặc 100 lần (chia ra các lọ, mỗi lọ có 5 µl cộng hợp đặc 200 lần,

khi dùng chỉ cần cho 1000 µl dung dịch pha loãng để có cộng hợp sử dụng cho kỹ thuật).

- Kiểm tra cộng hợp khi chia ra lọ, dán nhãn.
- Bảo quản tủ - 20°C.

* Điều kiện để thực hiện kỹ thuật chế tạo cộng hợp là phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp II, thực hiện kỹ thuật trong điều kiện nhiệt độ phòng từ 20°C-30°C, trừ những giai đoạn yêu cầu nhiệt độ 2-8°C.

c) Sản xuất huyết thanh chứng dương

- Kiểm tra hiệu giá kháng thể mẫu huyết thanh bệnh nhân sốt xuất huyết dengue trong kho lưu trữ bằng kỹ thuật MAC-ELISA.
- Chọn các mẫu có OD > 0,600.
- Trộn các mẫu có giá trị OD > 0,600
- Kiểm tra phát hiện HIV, HBsAg, HCV âm tính.
- Bất hoạt ở 56°C/60 phút.
- Chia lọ mỗi lọ có 10 µl huyết thanh chứng dương
- Bảo quản tủ - 20°C.

* Điều kiện để thực hiện kỹ thuật phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp II, thực hiện kỹ thuật trong điều kiện nhiệt độ khoảng 20°C-30°C.

d) Sản xuất huyết thanh chứng âm

- Chọn mẫu huyết thanh người lành của hãng Vital Product. Int. Cat. 6090 sử dụng là huyết thanh chứng âm (Không có IgM kháng virus dengue, virus viêm não Nhật Bản, khẳng định bằng kỹ thuật MAC – ELISA), đồng thời các mẫu kiểm tra không có các tác nhân virus lây truyền qua đường máu như HIV, HBV, HCV.
- Bất hoạt ở 56°C/ 30 phút.
- Chia huyết thanh chứng âm ra các lọ, mỗi lọ có 10 µl huyết thanh chứng âm.
- Bảo quản tủ - 20°C.

* Điều kiện để thực hiện kỹ thuật phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp II, thực hiện kỹ thuật trong điều kiện nhiệt độ phòng khoảng 20°C- 30°C.

e) Sản xuất thanh nhựa 16 giếng gắn kháng thể kháng IgM người

Pha kháng thể phủ bản trong dung dịch phủ bản theo công thức:

Thành phần	Hãng sản xuất	Số lượng (tính cho 500 ml)
Na ₂ CO ₃	La Bosi	12,95 g
NaHCO ₃	La Bosi	14,65 g
Nước cất	Vabiotech	vừa đủ 500 ml

- Đo pH 9,6
 - Kháng thể gắn trên thanh nhựa là IgG để kháng IgM người chuỗi μ của hãng Cappel, Cat. Lot: 07227.
 - Dựa trên kết quả chuẩn độ hiệu giá kháng thể theo phương pháp bàn cờ với kỹ thuật MAC-ELISA, xác định hiệu giá kháng thể thích hợp để gắn bản.
 - Pha kháng thể theo hiệu giá đã chuẩn độ bằng dung dịch phủ trên thanh nhựa, để ở 2°C-8°C trong 60 phút để kháng thể hoàn toàn đồng nhất trong dung dịch phủ bản, đủ để phủ cho các thanh nhựa 16 giếng.
 - Phủ thanh nhựa 16 F (hãng sản xuất NUNC của Đan Mạch): cho mỗi giếng là 100 μ l/giếng kháng thể phủ bản đã pha đồng nhất.
 - Để 2°C-8°C qua đêm.
 - Block các giếng bằng dung dịch PBS (-) có 0,5 % BSA.
 - Rửa thanh nhựa bằng dung dịch PBS/1 lần.
 - Đóng gói trong giấy bạc, dán nhãn.
 - Bảo quản tủ - 20°C.
- f) Sản xuất dung dịch PBS-T

- Pha 8.000 ml PBS (-) đặc 10 lần theo công thức:

Thành phần	Nhà sản xuất	Số lượng (tính cho 8.000 ml)
NaCl	MERCK	640 g
KCl	MERCK	16 g
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	MERCK	225,6 g
KH ₂ PO ₄	MERCK	16 g
Nước cất 2 lần		vừa đủ 8.000 ml

- Sấy vô trùng.
- Kiểm tra pH 7,12
- Thêm TWEEN 20 (hãng sản xuất: Scharlau, batch: 69674) tỷ lệ 5 ‰.
- Để TWEEN 20 làm đồng nhất trong dung dịch PBS (-) đặc 10 lần ít nhất là 24 giờ.
- Chia lọ 25 ml/ lọ. Ra 300 lọ.
- Dán nhãn, bảo quản tủ 2 - 8°C.

*Điều kiện để thực hiện kỹ thuật phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp II, thực hiện kỹ thuật ở nhiệt độ phòng 20°C-30°C.

g) Sản xuất dung dịch pha loãng

- Pha 400 ml PBS (-) đặc 10 lần theo công thức:

Thành phần	Nhà sản xuất	Số lượng (tính cho 100 ml)	Số lượng (tính cho 400 ml)
NaCl	MERCK	8,0 g	32,0 g
KCl	MERCK	0,2 g	0,8 g
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	MERCK	282 g	11,28 g
KH ₂ PO ₄	MERCK	0,2 g	0,8 g
Nước cất 2 lần		Vừa đủ 100 ml	Vừa đủ 400 ml

- Pha loãng 400 ml PBS (-) đặc 10 lần được 4.000 ml PBS (-) đặc 1 lần
- Sấy vô trùng.
- Thêm đỏ phenol 0,2 % tỷ lệ 1 %.
- Đo pH 7,20.
- Chia lọ 20 ml/lọ.
- Dán nhãn, bảo quản tủ 2 - 8°C.

*Điều kiện để thực hiện kỹ thuật phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp II, thực hiện kỹ thuật trong điều kiện nhiệt độ phòng 20°C-30°C.

h) Sản xuất cơ chất

- Dung dịch cơ chất Tetramethylbenzidine (TMB) do hãng KPL, Hoa Kỳ sản xuất và cung ứng, Cat. 50 – 76 – 02.
- Chia lọ: 1 ml/lọ
- Dán nhãn, bảo quản ở 2 - 8°C.

*Điều kiện để thực hiện kỹ thuật này ở phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp II, ở nhiệt độ phòng khoảng 20°C -30°C.

i) Sản xuất dung dịch pha cơ chất

- Dung dịch pha cơ chất TMB do hãng KPL, Hoa kỳ sản xuất và cung ứng, Cat. 50-76-02.
- Chia lọ 1 ml/lọ, ra 300 lọ dung dịch pha cơ chất
- Dán nhãn.
- Bảo quản tủ 2 - 8°C.

*Điều kiện để thực hiện kỹ thuật phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp II, ở nhiệt độ phòng khoảng 20°C-30°C.

j) Sản xuất dung dịch dừng phản ứng

- Pha dung dịch theo công thức:

Thành phần	Hãng sản xuất	Số lượng (600 ml)
H ₂ SO ₄ .4N	MERCK	63.6 ml
Nước cất		vừa đủ 600 ml

Chia lọ: 2ml/lọ.

- Dán nhãn, bảo quản ở tủ lạnh 2 - 8°C.

*Điều kiện để thực hiện kỹ thuật phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp II, thực hiện kỹ thuật ở nhiệt độ phòng 20°C-30°C.

2) Đóng gói các thành phần của kit kèm theo hướng dẫn sử dụng kit

Đóng gói 5 thành phần sinh phẩm bao gồm: Kháng nguyên, chứng dương, chứng âm, cộng hợp, thanh nhựa gắn kháng thể; Tất cả 5 thành phần này được đóng gói trong túi ni-lon, dán nhãn, bảo quản ở - 20°C.

Đóng gói 5 thành phần dung dịch và hóa chất của kit bao gồm: Dung dịch pha loãng, dung dịch PBS-T x 10, dung dịch pha cơ chất, cơ chất, dung dịch dừng phản ứng. Tất cả 5 thành phần này được đóng gói trong túi ni-lon, dán nhãn, bảo quản ở 2 - 8°C, kèm theo bản hướng dẫn sử dụng kit

Sau khi được sản xuất, kit được kiểm tra bằng kỹ thuật MAC – ELISA (theo hướng dẫn của nhà thiết kế kit); Kết quả các kit được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế đều đáp ứng tiêu chí kỹ thuật MAC – ELISA cho phát hiện kháng thể IgM kháng virus dengue, chỉ điểm cho tình trạng mới nhiễm virus.

Ví dụ 2: Thử nghiệm phát hiện IgM kháng virus dengue bằng cách dùng kit được tạo ra bằng phương pháp theo sáng chế

- Hướng dẫn sử dụng sinh phẩm của kit và các bước thực hiện

Tất cả các hoá chất và sinh phẩm phải được chuẩn bị trước khi sử dụng 10 phút. Sau khi đã pha loãng, tất cả sinh phẩm nên được sử dụng trong vòng 24 tiếng.

Pha loãng dung dịch rửa PBS – T x 10:

Dung dịch PBS -T đặc 10 lần, cho nước cất vừa đủ 250 ml để rửa bản nhựa.

Pha loãng chứng âm và chứng dương 1: 100

- Cho vào mỗi lọ chứng dương và chứng âm 1 ml dung dịch pha loãng.
- Lắc đều, giữ ở 4°C hoặc trên khay đá lạnh.

Pha loãng mẫu bệnh phẩm cần xét nghiệm (*một kit sử dụng để xét nghiệm cho 10 mẫu bệnh phẩm, trừ các mẫu chứng*):

Công thức pha mẫu bệnh phẩm:

- Huyết thanh (HT) bệnh nhân pha loãng với tỷ lệ 1/ 100:

10µl HT + 990µl dung dịch pha loãng

- Plasma bệnh nhân pha loãng với tỷ lệ 1/100:

100µl DNT + 990µl dung dịch pha loãng

Cho mẫu vào thanh nhựa

- Để thanh nhựa ở nhiệt độ phòng xét nghiệm để cân bằng nhiệt, rửa thanh nhựa 1 lần bằng dung dịch PBS-T.
- Cho vào mỗi giếng 100µl lần lượt mẫu chứng dương, chứng âm, dung dịch pha loãng (Blank), các mẫu cần xét nghiệm theo như sơ đồ (một mẫu chứng được kiểm tra trên 2 giếng, mẫu xét nghiệm được kiểm tra trên 1 giếng để kiểm soát chất lượng của kỹ thuật xét nghiệm).

A	B	C	D	E	F	G	H
Chứng dương		Chứng âm		Blank		Mẫu 1	Mẫu 2
Mẫu 3	Mẫu 4	Mẫu 5	Mẫu 6	Mẫu 7	Mẫu 8	Mẫu 9	Mẫu 10

- Ủ mẫu ở nhiệt độ phòng trong vòng 1 giờ.
- Rửa thanh nhựa, trước hết loại bỏ phần mẫu có trong các giếng vào một bình chứa chất thải, sau đó rửa thanh nhựa bằng dung dịch PBS- T: Cho

dung dịch rửa (PBS -T) vào đầy các giếng ($\geq 300 \mu\text{l}$) để khoảng 1 phút, đổ dung dịch rửa. Làm nhắc lại 3 lần (có thể rửa bằng tay hoặc máy).

Cho tiếp xúc kháng nguyên

- Pha loãng kháng nguyên: Cho 1 ml dung dịch pha loãng vào lọ kháng nguyên.

- Lắc nhẹ đều, giữ lạnh trên khay đá (tránh tạo bọt).

- Cho 50 μl kháng nguyên đã pha loãng vào mỗi giếng.

Lưu ý: Có thể ủ nhiệt độ phòng trong 1 giờ hoặc ủ ở 2°C-8°C qua đêm.

- Rửa thanh nhựa bằng dung dịch PBS-T: Cho dung dịch rửa (PBS-T) vào đầy các giếng ($\geq 300 \mu\text{l}$) để khoảng 1 phút, đổ dung dịch rửa. Làm nhắc lại 3 lần.

Cho tiếp xúc cộng hợp

- Cho 1ml dung dịch pha loãng vào lọ cộng hợp.

- Lắc đều, giữ lạnh trên khay đá.

- Cho 50 μl cộng hợp đã pha loãng vào các giếng.

- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.

- Rửa thanh nhựa bằng dung dịch PBS-T: Cho dung dịch rửa (PBS-T) vào đầy các giếng ($\geq 300 \mu\text{l}$) để khoảng 1 phút, đổ dung dịch rửa. Làm nhắc lại 5 lần.

Cho tiếp xúc cơ chất

- Pha dung dịch cơ chất: Chỉ chuẩn bị trước khi cho vào phản ứng. Cho 1ml dung dịch pha cơ chất vào 1ml dung dịch TMB lắc kỹ (chú ý tránh ánh sáng).

- Cho vào mỗi giếng 100 μl dung dịch cơ chất.

- Ủ ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

- Khi thấy có sự chuyển màu rõ ở các giếng mẫu chứng dương, trước khi có sự đổi màu ở các giếng mẫu chứng âm cần dừng phản ứng ngay; Hoặc sau 7-15 phút kiểm tra sự chuyển màu của các giếng mẫu chứng dương và mẫu chứng âm để dừng phản ứng.

Dừng phản ứng: Bằng cách cho vào mỗi giếng 100 μ l dung dịch H₂SO₄.4N.

Đọc kết quả: Ngay sau khi dừng phản ứng, đọc kết quả bằng máy đọc ELISA bằng bước sóng kép 450nm/620nm.

Tiêu chuẩn nhận định kết quả:

Giá trị ngưỡng là 2, với điều kiện các chứng:

OD blank, OD chứng âm $\leq 0,200$; OD chứng dương / OD chứng âm ≥ 2 .

Với điều kiện sự chênh lệch về kết quả OD của 2 giếng cho một mẫu chứng không được quá 10% (là bằng chứng để khẳng định sự ổn định và lặp lại kết quả xét nghiệm theo tiêu chí nội kiểm soát chất lượng xét nghiệm).

Các mẫu xét nghiệm dương tính khi:

OD mẫu xét nghiệm / OD chứng âm ≥ 2

Các mẫu xét nghiệm âm tính khi:

OD mẫu xét nghiệm / OD chứng âm < 2

Số liệu kết quả xét nghiệm khi sử dụng kit

Tiêu chí	OD		Trung bình cộng OD	% CV*
	1	2		
Chứng dương	0,628	0,634	0,635	0,67
Chứng âm	0,057	0,053	0,055	2,61
Blank	0,057	0,055	0,056	2,57
Mẫu HT 1	0,827	Tiêu chí kiểm soát kỹ thuật: Đạt yêu cầu Nhận xét kết quả xét nghiệm: Mẫu xét nghiệm dương tính khi: OD mẫu xét nghiệm/OD mẫu chứng >2 Mẫu xét nghiệm âm tính khi: OD mẫu xét nghiệm/OD mẫu chứng <2 Theo kết quả xét nghiệm: Không có mẫu		
Mẫu HT 2	0,079			
Mẫu HT 3	0,228			
Mẫu HT 4	0,212			
Mẫu HT 5	0,765			
Plasma BN 1	0,830			
Plasma BN 2	0,072			

Plasma BN 3	0,240	nào nghi ngờ. Mẫu HT và Plasam của cùng bệnh nhân có kết quả tương tự nhau.
Plasma BN 4	0,298	
Plasma BN 5	0,775	

Kết quả OD trung bình của mẫu chứng làm lặp lại đạt yêu cầu khi sự sai khác kết quả giữa hai giếng của một mẫu chứng $<10\%$ (lý tưởng $<5\%$).

Thực tế kết quả xét nghiệm:

- OD trung bình của chứng âm là 0,056.
- OD trung bình của Blank là 0,057.
- OD trung bình của chứng dương là 0,635
- Kết quả xét nghiệm: OD của mẫu xét nghiệm HT bệnh nhân có giá trị tương tự kết quả xét nghiệm từ plasma của cùng một bệnh nhân.

Nhận định kết quả xét nghiệm:

- Các mẫu chứng đạt yêu cầu để nhận định kết quả xét nghiệm
- Bệnh nhân 1: dương tính
- Bệnh nhân 2: âm tính
- Bệnh nhân 3: dương tính
- Bệnh nhân 4: dương tính
- Bệnh nhân 5: dương tính

Kết quả cho thấy, kit phát hiện được IgM kháng virus dengue trong cả mẫu huyết thanh và mẫu plasma của cùng một bệnh nhân lấy mẫu trong cùng một thời điểm sau nhiễm virus là tương tự nhau.

Ví dụ 3: Thử nghiệm chứng minh độ nhạy và đặc hiệu của kit phát hiện IgM kháng virus dengue với một loại kit thương mại của Hoa Kỳ - OUS (2016) sử dụng cộng hợp CH 12D và CH 6b6c cho kit sản xuất tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (VSDTTU).

So sánh kết quả xác định độ nhạy bằng kit chế tạo với các kit khác

Loại mẫu (thời gian thu thập)	Mẫu xét nghiệm	Kit Viện VSDTTU				Kit OUS	Tỷ lệ
		CH 12D	Tỷ lệ	CH 6b6c	Tỷ lệ		
		(+)	%	(+)	%	(+)	%
Máu I (1-7 ngày)	50	23	46,0	36	72,0	34	68,0
Máu II (8-14 ngày)	50	50	100	50	100	50	100

Có 50 bệnh nhân sốt xuất huyết dengue được khẳng định bị nhiễm virus dengue bằng kết quả phân lập virus, có cặp máu kép để kiểm tra độ nhạy của kit. Kết quả đối với mẫu máu II lấy sau mắc bệnh 7 ngày tỷ lệ xác định dương tính bằng các kit và các loại cộng hợp khác nhau là 100%. Nhưng đối với mẫu máu lấy trong giai đoạn sớm của bệnh (máu I), độ nhạy của kit chế tạo với cộng hợp 6b6c cao hơn so với loại cộng hợp 12D và kit của OUS của Hoa Kỳ.

So sánh kết quả xác định độ đặc hiệu bằng kit chế tạo

Dàn mẫu xét nghiệm	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu (+)	Tỷ lệ
HT bệnh nhân VNNB	10	0	0
HT bệnh nhân sởi	10	0	0
HT bệnh nhân Rubella	10	0	0

Kết luận:

- Độ nhạy của kit chế tạo với cộng hợp 6b6c: Có kết quả xét nghiệm tương đồng rất cao và có khả năng phát hiện được cao hơn các trường hợp nhiễm virus dengue trong giai đoạn sớm (36/50) khi so sánh với kit của Hoa Kỳ (34/50).
- Về độ đặc hiệu của kit chế tạo với cộng hợp 6b6c: Kiểm tra kit với dàn mẫu kiểm tra độ đặc hiệu, xác định là 100%.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Phương pháp tạo kit ELISA để phát hiện nhiễm virus dengue theo sáng chế đã giúp cho việc chủ động được kit chẩn đoán trong nước, giá thành phù hợp với điều kiện kinh tế của Việt Nam (bằng khoảng 30% khi so với giá nhập ngoại). Điều quan trọng hơn là luôn có sẵn kit để xét nghiệm phục vụ cho công tác chẩn đoán bệnh, kịp thời định hướng cho điều trị và dự phòng bệnh. Sử dụng kit này để xét nghiệm có kết quả ngay trong ngày nhận mẫu, có khả năng phát hiện sớm tình trạng nhiễm virus dengue. Khi so sánh với sinh phẩm của Hoa Kỳ, kit MAC – ELISA trong sáng chế này có độ nhạy và đặc hiệu cao hơn và có ưu điểm hơn kit của Hoa Kỳ là kit này được khuyến cáo sử dụng để xét nghiệm cho cả mẫu huyết thanh hoặc mẫu huyết tương của bệnh nhân.

Đây là loại kit thiết kế cho 16 xét nghiệm trong phát hiện sớm nhiễm virus dengue từ mẫu huyết thanh hoặc plasma, là loại kit duy nhất có trên thế giới hiện nay, rất thuận lợi khi sử dụng nếu so sánh với các loại kit khác hiện nay.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

STT Tên tác giả, bài báo, tạp chí và năm xuất bản

- 1 Alcon S., Talarmin A., Debruyne M., Falconar A., Deubel V., Flamand M. (2002), "Enzyme- linked immunosorbent assay to dengue virus typ 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections", *J Clin Microbiol.*, 40 : 376-381.
- 2 Innis B. N., Nisalak A., Nimmannitya S., Kusalerdchariya S., Chongswasdi V., Suntayakonrn S., Puttisri P (1989). An enzyme-link immunosorbent assay to charaterize dengue infections where dengue and Japanese Encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop, Med.* 4(4): 418-427.
- 3 Intruction for use "Dengue virus IgM ELISA" IBL Internation German.
- 4 Martin D. A., Muth D. A., Brown T., Jonhson A. J., Karabatsos N. and Roehrig J. T. (2000). Standardization of Immunoglobulin M Capture Enzym-Linked Immunosorbent Assay for Routine Diagnosis of Arboviral Infections. *Journal of Clinical Microbiology*: 1823-1826.
- 5 Solomon T., Thao L. T. T., Dung N. M., Kneen R., Hung N. T., Nisalak A., Vaughn D. W., Farra J., Hien T. T., White N. J. and Cardosa M. J.(1998). Rapid diagnosis of Japanese Encephalitis by using an Immunoglobulin M Dot Enzyme Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998: 2030-2034.
- 6 Kuno, G. and I Gomez and DJ Gubler. 1991. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *Journal of Virol.Meth.* 33: 101-113.
- 7 Prince, Harry E., et al. 2008. Development of a more Efficient Algorithm for Identifying False-Positive Reactivity Results in a Dengue Virus Immunoglobulin M Screening Assay. *Clinical and Vaccine Immunology*. 15:v8:1304-1306.
- 8 Shu PY, Huang JH (2004), "Current advances in dengue diagnosis", *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 642-650.
- 9 Young, P., R., P. A. Hilditch, C. Bletchly, and W. Halloran (2000), "An antigen capture enzyme-linked immuno-sorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients", *J. Clin. Microbiol*, 38: 1053-1057.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tạo kit để phát hiện sớm nhiễm virus dengue (MAC-ELISA) bao gồm các bước: (i) sản xuất hỗn hợp kháng nguyên dengue 4 typ; (ii) sản xuất cộng hợp; (iii) sản xuất huyết thanh chứng dương; (iv) sản xuất huyết thanh chứng âm; (v) sản xuất thanh nhựa 16 giếng gắn IgG đề kháng IgM người; (vi) sản xuất dung dịch PBS-T; (vii) sản xuất dung dịch pha loãng mẫu; (viii) sản xuất cơ chất; (ix) sản xuất dung dịch pha cơ chất; và (x) sản xuất dung dịch dừng phản ứng; khác biệt ở chỗ:

bước (i) sản xuất hỗn hợp kháng nguyên dengue 4 typ được tiến hành như sau:

tiêm hỗn dịch virus dengue vào não chuột ở 1–3 ngày tuổi (gây nhiễm riêng rẽ từng typ virus); liều lượng tiêm là 0,01ml–0,02ml; sau 96 giờ, chuột ốm liệt, gặt não chuột bằng máy hút chân không; nghiền đồng nhất hỗn hợp não chuột nhiễm virus dengue 4 typ trong PBS pH 8 tạo hỗn dịch 20% bằng máy nghiền Nissei, Nhật Bản 5000 vòng/phút trong 7 phút; ly tâm 4.000 vòng/phút trong 60 phút ở 2–8°C, loại bỏ cặn; sử dụng protamin sulfat 1,2% để loại bỏ các thành phần của não chuột, để ở 2–8°C trong 60 phút; ly tâm 10.000 vòng/phút trong 60 phút ở 2–8°C thu nước nổi; bất hoạt kháng nguyên virus bằng formalin 0,006% để 2–8°C qua đêm, rồi đông khô kháng nguyên;

bước (ii) sản xuất cộng hợp được tiến hành như sau:

hoạt hóa kháng thể đơn dòng kháng virus dengue có ký hiệu MAB 6b6c; Tiếp đến, hoạt hóa enzym HRPO [HRPO do Sigma sản xuất, mã số sản xuất P8375 (Peroxidase from Horseradish - HRPO)] bằng 0,1M NaIO₄; gắn enzym HRPO và kháng thể đơn dòng đã hoạt hóa để tạo cộng hợp; rửa kháng thể gắn cộng hợp bằng amonisulfat bão hòa để loại enzym HRPO thừa không gắn vào kháng thể; làm đồng nhất cộng hợp trong dung dịch PBS (-) pH 7,2; thẩm tích qua đêm trong dung dịch PBS (-) pH 7,2; thu cộng hợp, bổ sung BSA, làm đồng nhất cộng hợp; chuẩn độ theo phương pháp bán cò bằng kỹ thuật ELISA để xác định hiệu giá.