

Phương pháp lưu giữ tế bào cho phản ứng miễn dịch peroxidase đơn lớp (IPMA) để xác định hàm lượng kháng thể chống lại virus PRRS độc lực cao.

Ngô Hữu Lai¹, Nguyễn Thị Mỹ Phương¹,

Phan Thị Thuỳ Trang¹, Lại Thị Huyền¹ và Yoshikazu Iritani²

Tóm tắt

Việc lưu giữ mô tế bào nuôi cấy nhiễm virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS) độc lực cao trong đĩa 96 giếng đã được tiến hành để dễ dàng xác định hàm lượng kháng thể trong huyết thanh bằng phản ứng miễn dịch peroxidase đơn lớp. Các phương pháp rửa đệm, cố định và làm khô đã được áp dụng cho việc lưu giữ trong tủ lạnh. Đã được tạo ra bằng phương pháp rửa đệm sau khi lưu giữ được sử dụng để đo hàm lượng IPMA thì thấy không có sự thay đổi về hàm lượng IPMA trước và sau khi lưu trữ 6 tháng, nhưng không đúng với 2 phương pháp cố định và làm khô. Tuy nhiên, cũng với phương pháp này khi đĩa được lưu trữ trong 1 năm thì hàm lượng IPMA có giảm nhẹ ở một số loại huyết thanh nhưng không phải với tất cả. Chúng tôi đã chỉ ra rõ ràng rằng phương pháp lưu trữ bằng cách rửa đệm là rất hữu ích và xác định nhanh chóng hàm lượng kháng thể kháng virus PRRS bằng phản ứng IPMA.

Từ khoá: Phản ứng IPMA, virus PRRS.

Method of storage cell for immunoperoxidase monolayer assay to measure antibody titer to against highly pathogenic PRRS virus.

Ngô Hữu Lai, Nguyễn Thị Mỹ Phương,

Phan Thị Thuỳ Trang, Lại Thị Huyền, Yoshikazu Iritani

Summary

Storage of tissue culture cell infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in 96-well microplate was conducted to measure easily immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) titer in serum. Washing buffer, fixed and dry methods were used for storage at refrigerator. When the microplate made by washing buffer method for storage was used to measure IPMA titer, there are no change in the IPMA titer before and after storages for 6 months, but not in other 2 methods. However, with the same method when the microplate was stored for 1 year, the IPMA titer was slightly decreased in some of serum but not all sera.

We showed clearly that the storage method by washing buffer was generally useful and measured quickly IPMA titer of antibody to PRRS virus.

Key words: IPMA test, PRRS virus.

I. Đặt vấn đề

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS) đã được biết đến là một bệnh quan trọng và gây thiệt hại kinh tế đáng kể cho các trại lợn trên nhiều nước. Ở Việt Nam, sự thiệt hại kinh tế của các trại lợn còn nghiêm trọng hơn so với những nước khác do sự xuất hiện của virus PRRS độc lực cao, bởi vì virus PRRS này có khả năng gây bệnh cao (1). Virus PRRS độc lực cao đã xuất hiện và bùng nổ tại Việt Nam vào năm 200

1. Cơ quan Thú y Vùng IV, Đà Nẵng. 2. Văn phòng JICA tại Việt Nam.

Phản ứng huyết thanh học là phản ứng quan trọng đối với các chẩn đoán PRRS. Đã có nhiều phương pháp xét nghiệm huyết thanh học để phát hiện kháng thể của virus PRRS được mô tả. Đó là những phương pháp như phản ứng miễn dịch peroxidase đơn lớp (immunoperoxidase monolayer assay - IPMA) (3), phản ứng miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (indirect immunofluorescent assay), phản ứng

ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) (4), phản ứng ức chế sự ngưng kết hồng cầu (hemagglutination-inhibition test) và phản ứng trung hoà (5). Việc sử dụng thích hợp các phương pháp thí nghiệm được xem xét bởi Christopher-Hennings et., Al (6).

Bộ kit ELISA dùng để chẩn đoán PRRS luôn có sẵn trên thị trường và rất hữu ích. Tuy nhiên, bộ kit này là rất đắt đối với người dùng. Hơn nữa, những bộ kit thương mại có sẵn không dùng những chủng virus của Việt Nam và Trung Quốc làm kháng nguyên. Một số nhà nghiên cứu cũng đã chỉ ra các phản ứng không đặc hiệu bởi những bộ kit bán sẵn khi thử đối với những lợn không mang mầm bệnh (SPF) (7).

Mặt khác, phản ứng IPMA có thể xác định được kháng thể đặc hiệu của PRRS. Phương pháp này đã được so sánh với phương pháp ELISA và chặn ELISA (blocking ELISA) (8, 9). Tuy nhiên, phương pháp IPMA là không dễ để thực hiện vì phải nuôi cấy tế bào và nó cần một tuần để chuẩn bị gây nhiễm tế bào với virus PRRS trên đĩa 96 giếng để dùng cho phản ứng. Vì vậy, phương pháp này không thích hợp trong phòng thí nghiệm chẩn đoán thông thường cho những thí nghiệm hàng ngày.

Trong khuôn khổ bài báo này chúng tôi xin mô tả một phương pháp để lưu giữ các tế bào bị nhiễm virus PRRS độc lực cao trong đĩa 96 giếng để dễ dàng và nhanh chóng sử dụng cho phản ứng IPMA.

II. Nguyên liệu và phương pháp

2.1 Nguyên liệu

Virus PRRS: 196VN chủng virus PRRS phân lập được từ thực địa tại Việt Nam (VN) năm 2007 từ tiến sĩ Ken Inui đã được sử dụng cho thí nghiệm này. Những chủng virus này có đặc tính tương tự như chủng PRRS độc lực cao của Trung Quốc (10).

Huyết thanh dùng cho phản ứng:

Huyết thanh lợn sạch không nhiễm bệnh có bán sẵn trên thị trường được dùng như là huyết thanh âm tính với kháng thể PRRS (đối chứng âm). Huyết thanh dương tính (đối chứng dương) và huyết thanh dùng để kiểm tra được thu thập từ những mẫu thực địa năm 2008 đã được dùng cho phản ứng này (10). Các mẫu huyết thanh được vô hoạt ở 56 °C trong 45 phút. Chúng được pha loãng với dung dịch PBS có chứa 1% Tween 80 và 5% skim milk ở cấp độ pha loãng số 4 bắt đầu từ 1:10.

2.2 Phương pháp

Nuôi cấy tế bào:

Tế bào MARC - 145 được sử dụng để nhân giống virus PRRS độc lực cao (10). Tế bào này được nuôi cấy trong bình tam giác có chứa EME (Eagle's Minimum Essential Medium) với 5% huyết thanh bê ở 37°C trong 3 đến 4 ngày. Tế bào được thu hoạch bằng trypsin và sau đó rửa 3 lần với PBS bằng cách ly tâm. Các tế bào được điều chỉnh để đạt 5×10^4 /ml trên GM (Growth Medium) sau đó chia ra các giếng trên đĩa gồm 96 giếng với lượng 100 µl/giếng.

Chuẩn bị tế bào nhiễm:

196VN chủng virus PRRS-VN được pha loãng để tạo 500TCID₅₀/ml bằng dung dịch GM và sau đó dùng 100µl phủ lên mỗi giếng có chứa tế bào MARC trong đĩa 96 giếng đã chuẩn bị ở trên. Chúng được nuôi cấy ở 37°C trong tủ ẩm CO₂ trong 2 ngày. Môi trường nuôi cấy trong mỗi giếng sẽ được loại bỏ sau khi quan sát thấy các biến đổi bệnh lý tế bào điển hình trên bề mặt của giếng đã được nhiễm virus PRRS. Sau đó cố định tế bào bằng 100 µl PBS có chứa 10% formalin và 1% NP-40 (dung dịch cố định) cho mỗi giếng. Chúng được giữ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút để cố định.

Lưu giữ tế bào nhiễm virus PRRS độc lực cao trong đĩa 96 giếng;

Chúng tôi đã dùng 3 phương pháp để lưu giữ tế bào đó là phương pháp rửa, cố định và làm khô. Phương pháp rửa được thực hiện sau bước cố định tế bào trong đĩa 96 giếng đã nêu ở trên. Tế bào được rửa nhanh 3 lần bằng dung dịch đệm rửa có chứa 1% Tween 80 ở nhiệt độ phòng (phương pháp rửa). Đĩa được bịt kín lên trên bề mặt của giếng bằng băng dính (Happy Co., Ltd) sau khi cho thêm vào 100 µl dung dịch đệm rửa rồi cất chúng vào tủ lạnh cho đến khi dùng. Phương pháp cố định được thực hiện khi thêm 100 µl dung dịch cố định vào mỗi giếng sau khi rửa bằng dung dịch đệm rửa. Đĩa được bịt kín và lưu giữ giống như phương pháp rửa. Phương pháp làm khô là phương pháp mà không cho thêm dung dịch đệm rửa hoặc dung dịch cố định vào đĩa 96 giếng sau khi đã rửa nhanh bằng dung dịch đệm rửa. Việc lưu giữ được thực hiện giống như 2 phương pháp trên.

Xác định hiệu giá IPMA:

Đĩa 96 giếng chứa tế bào nhiễm trước hoặc sau khi lưu giữ trong tủ lạnh được rửa 2 lần với đệm pha loãng. 50µl huyết thanh đã pha loãng ở trên được chuyển tới từng giếng trên đĩa và sau đó đặt vào tủ ấm 37°C trong 30 phút. Đĩa được rửa tiếp 3 lần bằng dung dịch đệm rửa và thêm vào 50µl IgG thô kháng lợn đã được tiếp hợp peroxidase (US Biological) vào mỗi giếng. Chúng lại được ủ ở 37°C trong 30 phút và rửa 3 lần với dung dịch đệm rửa. Chất nền bao gồm 1ml dung dịch AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) nguyên chất, 14 ml dung dịch acetate 0,1 M và 15µl H₂O₂ 30% đã được cho vào mỗi giếng và quan sát các biến đổi bệnh lý tế bào bằng kính hiển vi đảo ngược (inverted microscope). Hiệu giá đã xuất hiện ở nồng độ pha loãng cao nhất của huyết thanh.

III. Kết quả và thảo luận

Bảng 1. So sánh hiệu giá kháng thể bằng phản ứng miễn dịch peroxidase đơn lớp khi áp dụng 3 phương pháp lưu giữ tế bào trong 1 tháng

STT Huyết thanh ⁽¹⁾	Trước khi lưu trữ	Các phương pháp lưu trữ		
		Rửa	Cố định	Làm khô
1	1:640	1:640	<1:10	<1:10
2	1:640	1:640	<1:10	<1:10
3	1: 40	1:40	<1:10	<1:10
4	1:160	1:160	<1:10	<1:10
5	1: 160	1:160	<1:10	<1:10
6	1: 640	1:640	<1:10	<1:10
7	1:40	1:40	<1:10	<1:10
8	1:160	1:160	<1:10	<1:10
9	1:40	1:40	<1:10	<1:10
Đối chứng âm	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10
Đối chứng âm	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10
Đối chứng dương	1:640	1:640	<1:10	<1:10

⁽¹⁾. Đối chứng âm và đối chứng dương lần lượt là huyết thanh âm tính và dương tính với virus PRRS.

Bảng 1 cho thấy sự so sánh về hiệu giá IPMA trong huyết thanh bằng phương pháp IPMA. Các hiệu giá IPMA trong đĩa 96 giếng sau khi lưu giữ ở tủ lạnh trong vòng 1 tháng bằng phương pháp rửa cho thấy là giống nhau trong nhiều loại huyết thanh, trong khi lại không thấy hiệu giá trong đĩa được

lưu giữ bằng phương pháp cố định và làm khô sau 1 tháng trong tủ lạnh. Sự biến đổi bệnh lý tế bào do virus PRRS được quan sát thấy trong các tế bào lưu trữ bằng phương pháp rửa và làm khô, cho dù các tế bào này không được nhuộm bằng các chất nền. Điểm gắn kết liên hợp trên bề mặt tế bào nhiễm virus PRRS có thể bị tác động một cách nhanh chóng bởi dung dịch AEC khi lưu trữ. Dựa theo kết quả này, chúng tôi đã chọn phương pháp rửa để lưu trữ đĩa trong tủ lạnh.

Bảng 2. Hiệu giá IPMA khi dùng phương pháp rửa bằng dung dịch đệm sau khi lưu trữ trong tủ lạnh

STT huyết thanh ⁽¹⁾	Trước khi lưu trữ	Thời gian lưu trữ (tháng)		
		2	6	12
1	1:640	1:640	1:640	1:640
2	1:640	1:640	1:640	1:640
3	1:40	1:40	1:40	1:10
4	1:160	1:160	1:160	1:40
5	1:160	1:160	1:160	1:40
6	1:640	1:640	1:640	1:160
7	1:40	1:40	1:40	1:10
8	1:160	1:160	1:160	1:40
9	1:40	1:40	1:40	1:10
Đối chứng âm	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10
Đối chứng âm	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10
Đối chứng dương	1:640	1:640	1:640	1:640

⁽¹⁾, Đối chứng âm và đối chứng dương lần lượt là huyết thanh âm tính và dương tính với virus PRRS.

Bảng 2 cho thấy hiệu giá IPMA trong đĩa 96 giếng sau khi lưu trữ 2, 6 và 12 tháng tại tủ lạnh. Chúng tôi không thấy có sự khác biệt về hiệu giá IPMA sau khi lưu giữ trong khoảng thời gian dài. Tuy nhiên, hiệu giá IPMA có dấu hiệu giảm nhẹ khi lưu trữ trong khoảng 1 năm đối với một số huyết thanh và khu vực biến đổi bệnh lý tế bào được quan sát giảm còn khoảng 70-80% sau khi được nhuộm màu bằng chất nền. Từ những dữ liệu này cho thấy chúng ta chỉ nên lưu trữ tế bào tối đa là trong vòng một năm.

Các đĩa 96 giếng lưu trữ tế bào trong 1 năm đã không hiển thị bị nhiễm vi khuẩn trong các giếng. Tween 80 không những có thể ngăn chặn vi khuẩn phát triển trong giếng mà còn có thể giữ những tế bào nhiễm virus PRRS trong thời gian dài ở tủ lạnh mà không làm mất đi hiệu giá IPMA.

Kết quả của chúng tôi cho thấy rõ ràng rằng phương pháp miễn dịch peroxidase đơn lớp sử dụng dung dịch đệm rửa rất dễ thực hiện và có thể tiến hành thường xuyên trong phòng thí nghiệm. Phương pháp đệm rửa rất dễ chuẩn bị cho đĩa 96 giếng có chứa tế bào nhiễm virus PRRS. Khi nhận được các mẫu từ thực địa, chúng tôi có thể nhanh chóng thông báo kết quả hiệu giá IPMA cho người gửi bằng việc sử dụng phương pháp này. Các đĩa 96 giếng được tạo ra bằng phương pháp rửa với dung dịch đệm có thể được gửi đến các phòng thí nghiệm, nơi không có trang thiết bị đặc biệt dùng cho nuôi cấy mô và tế bào, từ phòng thí nghiệm trung tâm để phát hiện hiệu giá kháng thể của virus PRRS độc lực cao bằng phương pháp IPMA. Chúng tôi hy vọng rằng phương pháp này sẽ được các nhà khoa học sử dụng nhiều trong phòng thí nghiệm.

Tài liệu tham khảo

- Long, V., N. et al. 2008. Novel highly pathogenic PRRS virus and challenge to pig production in Vietnam. OIE Regional Workshop on PRRS control and prevention. Hanoi
- Wensvoort G. et al., 1991. Mystery swine disease in the Netherlands; The isolation of leylstad virus. Vet. Quart. 13: 121 – 130.

- Yoon, I. G et al. 1992. An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera, *J . Vet . Diagn. Invest.*, 4 : 144 – 147.
 - Albina E., Leforban., Barton T., Planta. D. and Vannier P . 1992, An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann Rech. Vet.* 23 : 167 – 176.
 - Yoon. K.J., et al., 1955.Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J .Vet. Diagn. Invest.* 7: 305 – 312.
 - Christopher-Hennings, J. et al. 2002, Porcine reproductive syndrome (PRRS) diagnostics; Interpretation and limitation. *J. swine Health Prod. O*, 213-218.
 - Shibata, I., Yazawa, S. and Mori, M. 2001.Persistance of virus and antibodies in the sera of pigs experimentally infected with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Med. Sci.* 58: 805-807.
 - Nodelijk, Q. et al., 1996. Comparison of a commercial ELIZA and immunoperoxidase monolayer assay to detect antibodies directed against porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Vet. Microbial.* 49: 285-295.
 - Houben S., Callebaut P. and Pensaert M. B. 1995. Comparative study of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *J. Viro. Methods.* 32: 648-660.
7. Lai N. H., Phuong. N.T., Trang. P. T., Quang L.T., K. Inui and Y. Iritani. 2009. Surveillance of highly pathogenic PRRS virus by virus isolation in central Vietnam in 2008. *Vet. Sci. and Tech.* No 6. 9-12.