

PHẢN ỨNG TRUNG HÒA VIRUT PRRS TRÊN NUÔI CÂY TẾ BÀO VÀ ỨNG DỤNG

*Trần Thị Thanh Hà¹, Ken Inui², Phạm Thị Nga¹, Đặng Xuân Sinh¹,
Trịnh Quang Đại¹, Trương Anh Đức¹ và Nguyễn Việt Không¹.*

TÓM TẮT.

Trung hòa virus với huyết thanh trên nuôi cấy tế bào cho phép đánh giá được mức huyết thanh lợn miễn dịch trung hòa được virus PRRS có nguồn gốc khác nhau, sơ bộ đánh giá khả năng miễn dịch thể bao hộ.

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã thiết lập phương pháp trung hòa virus (VNT) PRRS trên tế bào Marc145, bước đầu sử dụng đánh giá hiệu giá trung hòa của lợn lành bệnh triệu chứng tại thực địa có so sánh với phương pháp chẩn đoán ELISA và IPMA. Khác với kết quả ELISA và IPMA, VNT cho thấy huyết thanh lợn nhiễm PRRS chủng Việt Nam chỉ trung hòa virus phân lập nội địa, không trung hòa các virus có nguồn gốc Châu Âu và Bắc Mỹ. VNT tỏ ra là phương pháp chiếm ưu thế hơn ELISA và IPMA trong đánh giá đáp ứng miễn dịch của lợn kháng chủng địa phương.

Từ khóa: Virus PRRS, Trung hòa, Tế bào Marc145, Huyết thanh.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome - PRRS) gây thiệt hại lớn đối với ngành chăn nuôi lợn ở Việt Nam và trên thế giới. Hàng năm, tại Mỹ ước tính thiệt hại do bệnh PRRS gây ra ở mức 720 triệu đô la Mỹ. Ở Việt Nam, thiệt hại kinh tế do PRRS gây ra chưa được ước tính, tuy nhiên trong những năm gần đây hàng loạt các trại lợn đã phải tiêu hủy do hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp. Bệnh được xếp vào nhóm các bệnh nguy hiểm trong danh mục các bệnh của Tổ chức thú y thế giới (OIE).

Cho đến nay, lợn là động vật duy nhất mắc hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản [7,8,9,11]. Việc khống chế dịch bệnh đang gặp nhiều khó khăn do chưa có loại vắc xin nào có thể bảo hộ đàn lợn hoàn toàn phòng chống được hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản. Để khẳng định có hay không kháng thể trung hòa sau khi tiêm phòng vắc xin hoặc sau khi con vật nhiễm bệnh, chúng tôi sử dụng phương pháp trung hòa huyết thanh.¹ Phương pháp này được Morrison và cs mô tả năm 1992, so với phương pháp IPMA kháng thể, phương pháp trung hòa kháng thể đối với virus PRRS là phương pháp tiêu chuẩn dùng để phát hiện sự xuất hiện kháng thể chậm. Phương pháp này được Yoon và cs cải tiến năm 1994 bằng cách pha loãng vi rút trong huyết thanh thường, làm tăng độ nhạy của phản ứng, cho phép phát hiện kháng thể trung hòa sớm khoảng 11 ngày sau khi gây nhiễm; đồng thời, có thể thấy sự khác biệt khi sử dụng các chủng vi rút có độ tương đồng khác nhau. Sự khác nhau này không quan sát được khi dùng phương pháp IFAT. Phương pháp trung hòa virus thường chỉ áp dụng được ở những phòng thí nghiệm có đủ điều kiện nuôi cấy tế bào, ít được sử dụng thường quy trong chẩn đoán. Tuy nhiên, phương pháp này có thể dùng cho những vi rút PRRS phân lập được có tính kháng nguyên khác nhau, đồng thời là phương pháp tối ưu xác định độ dài miễn dịch của cơ thể lợn đối với vi rút PRRS [7]. Ở Việt Nam, do điều kiện cơ sở vật chất phòng thí nghiệm chưa cho phép thực hiện việc công cường độc vì thế nó có thể được thay thế bằng phương pháp trung hòa virus trên tế bào.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung.

- Nuôi cấy tế bào Marc145
- Chuẩn độ virus PRRS
- Thiết lập phương pháp trung hòa virus PRRS trên môi trường tế bào Marc145
- Áp dụng phương pháp trung hòa virus đối với một số mẫu từ thực địa

2.2. Nguyên liệu.

¹ Viện Thú y, 2. Chuyên gia FAO tại Việt Nam

- Tế bào Marc145 có nguồn gốc từ Úc
- Môi trường MEM, Huyết thanh bào thai bê của hãng Gibco
- 3 chủng Virut PRRS: 0196 (chủng phân lập tại thực địa); Chủng Châu âu phân lập lại từ vacxin Amervac do bộ môn Hóa sinh - Miễn dịch- Bệnh lý và chủng Bắc Mỹ (chủng MLV) do chuyên gia FAO cung cấp.
- Chai nuôi cấy, đĩa nuôi cấy của hãng Corning.
- Huyết thanh âm chuẩn và dương chuẩn do chuyên gia FAO cung cấp Máy li tâm , tủ lạnh, safety cabinate và máy móc khác trong phòng thí nghiệm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu :

2.3.1. Nuôi cấy tế bào Marc145

Phương pháp nuôi cấy tế bào được thực hiện theo quy trình của CSIRO , Úc (The commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation)

2.3.2. Gây nhiễm virut PRRS trên tế bào Marc145 (được thực hiện theo hướng dẫn của OIE trong chương 2.08.07)

2.3.3. Xác định sự có mặt của virut PRRS bằng phản ứng RT-PCR

Đây là phương pháp thường quy tại bộ môn Hóa sinh- Miễn dịch -Bệnh lý, Viện thú y, phản ứng được tiến hành theo các bước như sau:

- (1) Tách chiết RNA bằng phương pháp Trizol
- (2) Tổng hợp cDNA bằng phương pháp sử dụng Random primer
- (3) PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu được thiết kế để phát hiện vi rút PRRS

2.3.4. Chuẩn độ virut

Phương pháp này được thực hiện theo quy trình của OIE , và tính TCID₅₀ theo phương pháp Read Muench [1]

Âm tính: Nếu ở độ pha loãng đó tế bào phát triển bình thường, không có bệnh tích tế bào (Giống đối chứng tế bào)

Dương tính: Nếu ở độ pha loãng đó xuất hiện bệnh tích trên tế bào (giống đối chứng virut)

2.3.4. Thiết lập phương pháp trung hòa virut trên môi trường tế bào (theo hướng dẫn của OIE trong chương 2.08.07 và Virology methods manual) [1,2,3,7,8]

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nuôi cấy tế bào

Để có tế bào ở trạng thái đang phát triển và phủ đầy 100% sau 1; 2 ngày thì lượng tế bào khi cấy chuyển cần 5×10^5 tế bào /ml; 2×10^5 tế bào/ml. Với mật độ và tình trạng phát triển của tế bào như trên, các thí nghiệm về gây nhiễm vi rút , nhân giống vi rút , chuẩn độ và phản ứng trung hòa đều đạt kết quả tốt.

3.2. Kết quả gây nhiễm virut PRRS trên tế bào Marc145

Qua gây nhiễm virut PRRS trên tế bào Marc145 cho thấy tùy từng chủng mà thời gian xuất hiện bệnh tích tế bào khác nhau và biểu hiện bệnh biến của tế bào cũng khác nhau. Bệnh tích điển hình là tế bào co cụm hình chùm nho hoặc tế bào bị phá hủy hoàn toàn

3.3. Xác định sự có mặt của virut PRRS bằng phản ứng RT-PCR

Sau khi nhân giống 03 chủng vi rút sẽ sử dụng trong nghiên cứu , để khẳng định lại sự có mặt của các chủng vi rút này, chúng tôi đã sử dụng phương pháp RT-PCR. với cặp mồi F2R2 có trình tự:

Fwd: 5'ATGTTGGGGAAATGCTTGACC3'

và Rev: 5'GTTCCGCTGAAACTCTGGTTA3'

Kết quả cho thấy cả 3 chủng vi rút PRRS sau khi được nhân lên trên tế bào Marc 145 đều cho kết quả PCR dương tính . Chứng tỏ việc gây nhiễm vi rút PRRS và nhân giống vi rút thành công.

3.4. Kết quả chuẩn độ các chủng virut PRRS

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành chuẩn độ 3 chủng virut: (1) chủng 0196, (2) chủng Châu Âu; (3) chủng MLV. Mỗi chủng vi rút PRRS được thực hiện chuẩn độ lặp lại 3 lần, kết quả các lần thực hiện đều giống nhau.

Bảng 1. Kết quả chuẩn độ các chủng virut PRRS

TT	Chủng virut PRRS	TCID ₅₀
1	0196	10 ^{6.5} /ml
2	Châu Âu	10 ^{5.5} /ml
3	MLV	10 ^{6.7} /ml

3.5. Kết quả thiết lập phản ứng trung hòa virut PRRS trên môi trường tế bào Marc145.

Để thiết lập phương pháp trung hòa trên môi trường tế bào Marc 145 đối với vi rút PRRS , chúng tôi đã sử dụng chủng vi rút cường độc phân lập tại thực địa và mẫu huyết thanh dương và âm đối với phương pháp ELISA và IPMA

Mẫu huyết thanh dương là mẫu huyết thanh thu được từ lợn được gây nhiễm vi rút PRRS nhân tạo và mẫu huyết thanh âm là mẫu huyết thanh thu thập từ lợn của những vùng không bị nhiễm bệnh PRRS, đã được sàng lọc bằng phản ứng ELISA và IPMA

Phản ứng trung hòa vir ut PRRS trên môi trường tế bào Marc145 được thiết lập trên cơ sở phản ứng trung hòa vi rút theo hướng dẫn của Virology methods manual [1]

Trong quá trình thiết lập phương pháp t rung hòa virut PRRS tại bộ môn HSMDBL , thí nghiệm đã được thực hiện lặp lại nhiều lần , và sau mỗi lần thí nghiệm , các điều kiện như nồng độ CO₂, thời gian ủ virut và huyết thanh, nhiệt độ thích hợp cho việc trung hòa virut...đều được tối ưu hóa sau từng thí nghiệm.

Kết quả: Phương pháp trung hòa đã được thiết lập gồm các bước như sau:

Bước 1: Chuẩn bị tế bào

Bước 2 : Chuẩn bị virut

Bước 3: Trung hòa huyết thanh

Bước 5: Đánh giá kết quả

Âm tính: Nếu ở độ pha loãng huyết thanh đó có bệnh biến tế bào (huyết thanh không trung hòa được vi rút).

Dương tính: Nếu tại giếng đó lớp tế bào vẫn phát triển tốt , bám đáy và không có bệnh tích tế bào.

Đối với các mẫu thí nghiệm : Ở các giếng có nồng độ huyết thanh cao : Lớp tế bào mọc đều, mịn và phát triển tốt, không có tế bào chết, không có bệnh biến tế bào. Ở các giếng có nồng độ huyết thanh thấp, xuất hiện các đám tế bào cụm lại, sau 5 ngày các đám tế bào bị bong ra và chết, khi nhuộm không còn hoặc rất ít tế bào bám đáy.

Kết quả cho thấy phản ứng trung hòa đã được thiết lập trên mẫu huyết thanh dương tính và âm tính chuẩn (theo phương pháp ELISA và IPMA) với chủng vi rút thực địa cường độc.

3.6. Kết quả áp dụng phản ứng trung hòa đối với một số mẫu huyết thanh dương, âm tính đối với ELISA

Sau khi thiết lập được phương pháp đề tài đã thực hiện phản ứng trung hòa đối với 20 mẫu huyết thanh của lợn sau khi bị bệnh PRRS tại Quảng Nam dương tính với ELISA và 5 mẫu huyết thanh âm tính với ELISA . Kết quả bước đầu cho thấy đối với các mẫu huyết thanh âm tính ELISA thì đồng thời cho kết quả âm tính đối với phản ứng trung hòa . Còn các mẫu dương tính ELISA cao cũng cho hiệu giá đối với VNT.

Chúng tôi cũng đã sử dụng các mẫu huyết thanh trên đối với 2 chủng vi rút Châu Âu và Bắc Mỹ, nhưng kết quả đều âm tính đối với tất cả các mẫu dương tính ELISA.

Bảng 2: Kết quả thực hiện phản ứng VNT đối với mẫu huyết thanh từ thực địa

TT	Ký hiệu mẫu	Gia súc	Tuổi	Kết quả ELISA S/P	Kết quả VNT (log2, chủng VN)	Kết quả VNT (log2, chủng EU)	Kết quả VNT (log2, chủng NA)
1	243	Lợn	5 tháng	3.96	8.00	0.00	0.00
2	257	Lợn	4 tháng	3.86	3.00	0.00	0.00
3	248	Lợn	4 tháng	3.78	7.00	0.00	1.00
4	246	Lợn	5 tháng	3.70	7.00	0.00	0.00
5	273	Lợn	5 tháng	3.67	7.00	0.00	0.00
6	269	Lợn	5 tháng	2.99	7.00	2.00	0.00
7	252	Lợn	4 tháng	2.97	6.00	0.00	0.00
8	253	Lợn	4 tháng	2.94	5.00	0.00	0.00
9	275	Lợn	5 tháng	2.92	6.00	1.00	0.00
10	256	Lợn	4 tháng	2.80	6.00	0.00	0.00
11	278	Lợn	4 tháng	2.35	4.00	2.00	1.00
12	259	Lợn	4 tháng	2.28	4.00	0.00	0.00
13	7	Lợn nái	36 tháng	2.15	4.00	0.00	0.00
14	5	Lợn	4.5 tháng	1.99	5.00	0.00	0.00
15	242	Lợn	5 tháng	1.97	2.00	0.00	0.00
16	245	Lợn	4 tháng	1.33	6.00	0.00	0.00
17	260	Lợn	4 tháng	0.97	3.00	0.00	0.00
18	261	Lợn	4 tháng	0.65	5.00	1.00	1.00
19	224	Lợn	3.5 tháng	0.50	3.00	0.00	0.00
20	222	Lợn	3.5 tháng	0.45	3.00	0.00	0.00
21	211	Lợn	5 tháng	0.00	1.00	0.00	0.00
22	212	Lợn	5 tháng	0.02	1.00	0.00	0.00
23	214	Lợn	5 tháng	0.01	1.00	0.00	0.00
24	215	Lợn	5 tháng	0.03	1.00	0.00	0.00
25	216	Lợn	5 tháng	0.04	1.00	0.00	0.00

Trong nghiên cứu này để so sánh kết quả của 2 phương pháp chúng tôi sử dụng công thức tính hệ số tương quan:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)}{(n-1) s_x s_y}$$

Bảng 3: Hệ số tương quan giữa kết quả ELISA và kết quả phản ứng trung hòa

Chủng virut	Hệ số tương quan
Chủng thực địa	0.883102
Chủng Bắc Mỹ	0.276098
Chủng Châu Âu	0.143956

Qua bảng trên cho thấy có sự tương quan giữa kết quả ELISA với kết quả VNT của chủng thực địa, và không có sự tương quan giữa kết quả ELISA với kết quả VNT của các chủng Châu Âu và Bắc Mỹ.

3.7. Kết quả thực hiện phương pháp IPMA đối với mẫu huyết thanh thực địa

Trong nghiên cứu này chúng tôi cùng đồng thời thực hiện phản ứng IPMA đối với các mẫu huyết thanh từ thực địa. Phản ứng IPMA có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, phương pháp này thường chỉ được sử dụng trong các phòng thí nghiệm có điều kiện nuôi cấy tế bào và gây nhiễm virut.

Bảng 4: Kết quả thực hiện phản ứng IPMA đối với mẫu huyết thanh thực địa

TT	Ký hiệu mẫu	Gia súc	Tuổi	Kết quả ELISA S/P ratio	Kết quả IPMA (chủng VN)	Kết quả IPMA (chủng EU)	Kết quả IPMA (chủng NA)
1	243	Lợn	5 tháng	3.96	4.00	3.00	3.00
2	257	Lợn	4 tháng	3.86	4.00	3.00	2.00
3	248	Lợn	4 tháng	3.78	4.00	3.00	3.00
4	246	Lợn	5 tháng	3.70	4.00	3.00	3.00
5	273	Lợn	5 tháng	3.67	4.00	3.00	3.00
6	269	Lợn	5 tháng	2.99	4.00	3.00	4.00
7	252	Lợn	4 tháng	2.97	4.00	3.00	3.00
10	256	Lợn	4 tháng	2.80	3.00	3.00	2.00
12	259	Lợn	4 tháng	2.28	3.00	2.00	2.00
14	5	Lợn	4.5 tháng	1.99	4.00	2.00	3.00
15	242	Lợn	5 tháng	1.97	3.00	2.00	2.00
21	211	Lợn	5 tháng	0.00	0.00	0.00	0.00
22	212	Lợn	5 tháng	0.02	0.00	0.00	0.00
23	214	Lợn	5 tháng	0.01	0.00	0.00	0.00
24	215	Lợn	5 tháng	0.03	0.00	0.00	0.00
25	216	Lợn	5 tháng	0.04	0.00	0.00	0.00

Kết quả bước đầu cho thấy khi thực hiện đối với cả 3 chủng virut đều cho kết quả âm tính và dương tính rõ.

Bảng 5: Hệ số tương quan giữa kết quả ELISA và kết quả phản ứng IPMA

Chủng virut	Hệ số tương quan
Chủng thực địa	0.951706
Chủng Bắc Mỹ	0.894025
Chủng Châu Âu	0.977332

Qua bảng kết quả về hệ số tương quan cho thấy kết quả thực hiện phản ứng IPMA trên cả 3 chủng đều có tương quan đối với kết quả của phản ứng ELISA.

Bảng 6: Hệ số tương quan giữa kết quả trung hòa và kết quả phản ứng IPMA

Chủng virut	Chủng thực địa	Chủng Bắc Mỹ	Chủng Châu Âu
Chủng thực địa	0.866012	0.210092	0.210092
Chủng Bắc Mỹ	0.210092	0.213021	0.402374
Chủng Châu Âu	0.210092	0.402374	0.220564

Chỉ có sự tương quan giữa kết quả của phản ứng trung hòa và IPMA của chủng virut thực địa. Còn kết quả của các chủng khác không có sự tương quan.

IV. Kết luận:

Trong nghiên cứu này chúng tôi có những kết luận như sau:

- Phản ứng trung hòa tế bào đối với vi rút PRRS đã được thiết lập tại bộ môn Hóa sinh Miễn dịch - Bệnh lý, Viện thú y.
- Phương pháp được thiết lập gồm các công đoạn : (a) Chuẩn bị tế bào ; (b) Chuẩn bị vi rút ; (c) Trung hòa huyết thanh; (d) Đọc kết quả phản ứng
- Bước đầu áp dụng phương pháp trung hòa đối với mẫu thực địa và có sự so sánh kết quả với 2 phương pháp ELISA và IPMA.
- Kết quả trung hòa của các mẫu huyết thanh của gia súc bị bệnh từ thực địa đều âm tính đối với các chủng Châu Âu và Bắc Mỹ.
- Đối với chủng vi rút Châu Âu và Bắc Mỹ kết quả của phản ứng ELISA không tương đồng với kết quả của phản ứng trung hòa vi rút.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Brian WJ Mahy and Hillar O Kangro (1996) Virology methods manual, Chapter 6- P108; P195-199
2. Enuh Rahario JUSA, yuji INABA, Michihiro KOUNO, Omasu HIRUE, Hisao YASUHARA (2005), Slow reacting and complement requiring neutralizing antibody in swine infected with PRRS virut - *Journal of General Virology* 86, P1943–1951
3. E. Albina (1998) Immune responses in pigs infected with PRRS- *Veterinary Immunology and Immuno-pathology* P49-66
4. I. Di'az,1,2 L. Darwich,1,2 G. Pappaterra,3 J. Pujols1,3 and E. Mateu1,2 Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Journal of General Virology* (2005), 86, P1943–1951
5. Gonnje Nodelijk (1996) comparison of commercila ELISA and immune peroxidase monolayer assay to detect antibodies directed against PRRS, *Veterinary Microbiology* P285-295
6. Michael O'Connor_Irish (2002), Detection of antibody to PRRS virus by ELISA and IPMA, *Veterinary Journal*, P73 -75
7. Nettebotner (1997), Diagnosis of PRRS, *Veterinary Microbiology*, P295-301.
8. OIE Terrestrial Manual (2008) Porcine reproductive and respiratory syndrome Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, P1116-1127.
9. J.Plana-Duran (1997) Efficacy of inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by PRRS, *Veterinary Microbiology*, P361-370
10. R.W.Wills (1997), PRRS a persistent infection.pdf, *Veterinary Microbiology* P231-240
11. Zygmunt Pejsak (1997) Clinical signs and economic losses caused by porcine reproductive and resiratory syndrome virus in a large breeding farm, *Veterinary Microbiology* P317-322