

## **ỨNG DỤNG MỘT SỐ KỸ THUẬT TRONG CHẨN ĐOÁN VÀ PHÂN LẬP VIRUS GÂY HỘI CHỨNG RỐI LOẠN SINH SẢN VÀ HÔ HẤP TRÊN LỢN NÁI**

### **Application of Some Techniques to Diagnose and Isolate Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus from Sows**

Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Thị Hoa, Tiêu Quang An

*Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

Địa chỉ email tác giả liên lạc: *lanjp2000@yahoo.com*

#### **TÓM TẮT**

Kỹ thuật bệnh lý và hóa miễn dịch tổ chức đã được sử dụng để phát hiện virus có trong 5 lợn nái bị nghi mắc hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome-PRRS). Sau đó, các mẫu bệnh phẩm gồm: phổi, hạch phổi, tử cung từ các lợn nái đó đã được sử dụng để phân lập virus trên dòng tế bào Marc 145. Các chủng virus PRRS gây bệnh cho lợn nái ở Việt Nam phát triển tốt trên môi trường tế bào Marc 145 và gây nên bệnh tích tế bào, bệnh tích tế bào xuất hiện sau 48 giờ gây nhiễm.

**Từ khóa:** Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (PRRS), lợn nái, phân lập, virus.

#### **SUMMARY**

Pathological and immunohistochemical techniques were applied to detect target virus from 5 sows infected with PRRS (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome). After that, samples of lung, pulmonary lymphnode and uterus of the above sows were used for isolation of PRRS virus in Marc 145 cell line. It was found that the virus causing PRRS in sows in Viet Nam could be isolated and grew well in Marc 145 cell line with cito pathogenic effect (CPE) observed 48h after inoculation in all samples.

**Key words:** Isolation, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS), sows, virus.

### **1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Hiện nay, ngành chăn nuôi nước ta đang ngày càng được chú trọng phát triển và giữ một vị trí quan trọng trong nền kinh tế quốc dân, trong đó, chăn nuôi lợn đã trở thành nguồn thu nhập chủ yếu đối với nhiều hộ nông dân. Cùng với sự phát triển của ngành chăn nuôi, vấn đề dịch bệnh luôn song hành và gây nhiều tổn thất cho người chăn nuôi, đặc biệt, chăn nuôi lợn nái đóng vai trò quan trọng trong việc cung cấp nguồn con giống nhưng thường xuyên bị đe dọa bởi dịch bệnh. Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (PRRS) là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm của loài lợn. Theo Nguyễn Hữu Nam và Nguyễn Thị Lan (2007), PRRS là bệnh phức tạp với

các đặc trưng là lợn nái sinh sản bị sảy thai, chết thai, thai khô hoặc lợn con sinh ra yếu. Chủng virus PRRS châu Âu đã được phân lập đầu tiên ở Hà Lan (Wenswoet và cs., 1991) và chủng PRRS Bắc Mỹ được tìm thấy ở Mỹ (Benfield và cs., 1992). Ở Việt Nam, những nghiên cứu về virus PRRS (PRRSV) nói chung còn rất ít. Theo Nguyễn Bá Hiên và Huỳnh Thị Mỹ Lệ (2007), đích tấn công của virus là các đại thực bào, đây là tế bào duy nhất có điểm cảm thụ (yếu tố cảm thụ) phù hợp với cấu trúc hạt virus. Vì vậy virus hấp thụ và thực hiện quá trình nhân lên chỉ trong tế bào này và phá huỷ nó. Tế bào Marc là đại thực bào phế nang của lợn thích hợp cho sự nhân lên của virus (Murakami và cs., 1994; Shimizu và cs., 1994).

Vì vậy, môi trường tế bào Marc 145 đã được sử dụng để tiến hành phân lập virus PRRS trên từ các lợn nái mắc bệnh được chẩn đoán bằng các kỹ thuật bệnh lý và hoá miễn dịch nhằm cung cấp thông tin cho các nghiên cứu sâu hơn về PRRSV góp phần vào việc sản xuất kit chẩn đoán và chế vaccine phòng bệnh.

## 2. NGUYÊN LIỆU - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu

- Các lợn nái nghi mắc PRRS (được mổ khám và lấy mẫu ở các phủ tạng như phổi, hạch phổi, tim, gan, lách...).

- Tế bào Marc 145 được nuôi cấy trên các đĩa lồng.

- Hoá chất, dụng cụ sử dụng trong kỹ thuật làm tiêu bản bệnh lý, kỹ thuật hoá mô miễn dịch và kỹ thuật nuôi cấy tế bào.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Sử dụng các phương pháp thí nghiệm thường quy trong phòng thí nghiệm bệnh lý như phương pháp mổ khám, phương pháp làm tiêu bản bệnh lý và các kỹ thuật mới như phương pháp hóa mô miễn dịch, phương pháp phân lập virus.

+ Phương pháp hóa mô miễn dịch (Immunohistochemistry - IHC): cho phép chẩn đoán chính xác lợn mắc PRRS. Mẫu bệnh phẩm sau khi được cắt thành tiêu bản bệnh lý sẽ được làm sạch parafin. Tiến hành hoạt hoá enzym bằng cách ngâm ngập tiêu bản trong dung dịch PBS (Phosphat buffer saline) 1X và hấp ướt ở 121°C trong 5 phút. Khử peroxylase nội sinh dùng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trong dung môi Methanol (tỉ lệ 1:9). Gắn kháng thể (KT), nhỏ KT kháng PRRSV chuẩn lên tiêu bản, ủ tiêu bản ở tủ ấm 37°C trong 1 giờ hoặc 4°C qua đêm. Rửa tiêu bản bằng dung dịch PBS (lặp lại 3 lần). Gắn kháng thể (KKT) có gắn enzyme (Dako-Japan) lên tiêu bản, ủ ở 37°C trong 1 giờ và rửa lại tiêu bản. Gắn cơ chất, ngâm tiêu bản trong dung dịch DAB (3,3'-diaminobenzidine) khoảng 3-8 phút. Tiến hành nhuộm nhân tế bào bằng

Hematoxylin, làm sạch và gắn baume Canada, quan sát kết quả trên kính hiển vi quang học.

+ Phương pháp phân lập virus gồm 3 bước:

*Bước 1* chuẩn bị tế bào phân lập: Tế bào Marc 145 được đưa vào nuôi cấy trong môi trường và điều kiện thích hợp, môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) có bổ sung 10% FBS (Fetal bovine serum) làm ấm trong tủ 37°C trong 30 phút trước khi lấy tế bào mọc vừa kín đáy đĩa lồng thì tiến hành gây nhiễm virus.

*Bước 2* chuẩn bị mẫu phân lập: Mẫu bệnh phẩm được nghiền nát bằng chày và cối vô trùng sau đó được đồng nhất trong dung dịch DMEM. Ly tâm tốc độ cao thu lại hỗn dịch. Hỗn dịch đồng nhất qua lọc được lấy để gây nhiễm vào tế bào Marc 145.

*Bước 3* gây nhiễm virus và quan sát kết quả: Từ các đĩa lồng tế bào đã chuẩn bị ở bước 1 hút bỏ môi trường nuôi cấy và bổ sung 100 µl mẫu đã chuẩn bị ở bước 2. Tế bào gây nhiễm virus được ủ ở 37°C với 5% CO<sub>2</sub> trong 30 phút. Bổ sung 1,5 ml môi trường DMEM có chứa 10% TPB (Tryptose Phosphate Broth) vào đĩa lồng và để ở 37°C với 5% CO<sub>2</sub>. Hàng ngày theo dõi sự phá huỷ tế bào bằng kính hiển vi soi nổi và thu lại virus khi tế bào bị phá huỷ đạt 80% - 90% diện tích đáy của đĩa lồng.

## 3. KẾT QUẢ

### 3.1. Một số đặc điểm bệnh lý chủ yếu của lợn nái mắc PRRS

Trên cơ sở thu thập các mẫu bệnh phẩm từ những lợn nái ở các địa phương khác nhau có các dấu hiệu đặc trưng của PRRS như: phát ban, khó thở, có nhũ mắt, tím tai, sảy thai, viêm vú mất sữa, nghiên cứu này đã chọn 5 lợn nái có bệnh tích điển hình để nghiên cứu tiếp. Các biến đổi bệnh lý của lợn nái mắc PRRS tập trung chủ yếu ở phổi, hạch lâm ba (HLB) và tử cung (Bảng 1 và 2; các hình 1, 2, 3, 4). Bên cạnh đó, các bệnh tích ở lách, thận và một số cơ quan khác là không đặc trưng và phụ thuộc vào tình trạng, diễn biến của bệnh cũng như sự kế phát của các bệnh khác.

**Bảng 1. Bệnh tích đại thể chủ yếu của 05 lợn nái mắc PRRS**

STT	Tên	Cơ quan					
		Phổi viêm	HLB sưng	Thận xuất huyết	Lách nhồi huyết	Cơ tim nhão	Tử cung viêm
1	Nái mang thai 1-N1	+++	++	-	-	-	+++
2	Nái mang thai 2-N2	++++	+++	+++	-	++	++++
3	Nái nuôi con 1-N3	++++	+++	+++	++	+++	++
4	Nái nuôi con 2-N4	+++	++	++	++	-	++
5	Nái nuôi con 3-N5	+++	++	-	-	-	++

Ghi chú: ++++ Rất nặng    +++ Nặng    ++Trung bình    +Nhẹ    - Không biểu hiện

**Bảng 2. Bệnh tích vi thể chủ yếu của 05 lợn nái mắc PRRS**

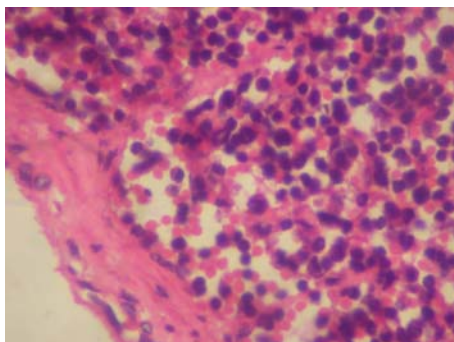
TT	Tên	Cơ quan				
		Phổi	HLB	Lách	Thận	Tử cung
1	N1	- Xuất huyết - Vách phế nang đứt nát	- Xuất huyết	- Xuất huyết	- Kê thận xuất huyết	- Thâm nhiễm tế bào viêm
2	N2	- Xuất huyết - Tế bào viêm ở phế nang	- Số lượng lâm ba cầu giảm	- Xuất huyết - Vách đứt nát	- Cầu thận viêm	- Tăng sinh tế bào xơ
3	N3	- Phế nang có dịch viêm và đại thực bào	- Nang lâm ba teo	- Tuỷ trắng teo lại, vách đứt nát	- Cầu thận viêm, lòng ống rộng có trụ trong	- Niêm mạc tử cung đứt nát
4	N4	- Phế quản phế viêm	- Xuất huyết	- Thoái hoá và hoại tử	- Xoang bao man giãn rộng	- Thâm nhiễm tế bào viêm
5	N5	- Kê phổi tăng sinh tế bào xơ	- Xuất huyết	- Xuất huyết	- Tế bào thận bị thoái hoá, hoại tử	- Không có biến đổi vi thể



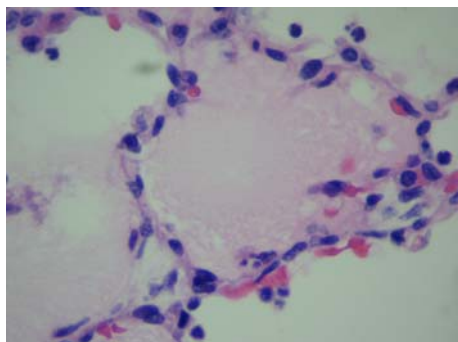
Hình 1. Phổi viêm



Hình 2. Thận xuất huyết



Hình 3. Hạch lâm ba xuất huyết (HE x40)



Hình 4. Dịch phù trong lòng phế nang (HE x40)

### 3.2. Kết quả nhuộm hoá mô miễn dịch

Từ các lợn nái nghi mắc PRRS được lựa chọn, nghiên cứu này tiến hành nhuộm hoá miễn dịch tổ chức với các mẫu phổi, hạch phổi và tử cung của 5 lợn trên để chẩn đoán xác định sự có mặt của virus PRRS làm cơ sở cho việc phân lập virus (Bảng 3).

Trên các block phổi, hạch phổi và tử cung của các lợn nái nghiên cứu được lựa chọn làm hoá miễn dịch đều cho kết quả dương tính với PRRSV biểu hiện là những đám tổ chức bắt màu vàng nâu trên tiêu bản vi thể của tổ chức phổi, hạch phổi, tử cung của lợn bệnh. Sở dĩ phổi, hạch phổi và tử cung được lựa chọn thực hiện kỹ thuật hoá mô miễn dịch vì những biến đổi bệnh lý của lợn nái mắc PRRS được quan sát thấy tập trung chủ yếu ở phổi, hạch phổi và tử cung. Virus PRRS có đặc điểm là rất thích hợp với đại thực bào, đặc biệt là đại thực bào vùng phổi. Đây là tế bào duy nhất có điểm cảm thụ phù hợp với cấu trúc hạt virus, vì thế virus hấp thụ và thực hiện quá trình nhân lên chỉ trong tế bào này và phá huỷ nó (Hình 5 và 6).

### 3.3. Kết quả phân lập PRRSV trên môi trường tế bào Marc145

5 lợn có các biểu hiện lâm sàng đặc trưng của PRRS sau khi được tiến hành mổ khám, lấy mẫu, bảo quản, làm tiêu bản vi thể và làm hoá miễn dịch xác định sự có mặt của virus, nghiên cứu đã tiến hành phân lập virus trên môi trường tế bào Marc 145 (Bảng 4).

Bệnh tích tế bào của virus PRRS được biểu hiện là các tế bào co cụm lại với nhau, chồi lên khỏi đáy bình nuôi cấy và khi tế bào bị virus phá huỷ hoàn toàn thì bong khỏi đáy bình, có thể quan sát rất rõ hình thái bệnh tích này bằng mắt thường. Tuy nhiên, thể CPE này cũng rất dễ nhầm lẫn với những tế

bào bị chết theo cơ chế Apoptosis nếu không quan sát kỹ. Để quan sát chính xác hơn cũng có thể dùng kính hiển vi điện tử quét để quan sát sự thay đổi hình thái tế bào.

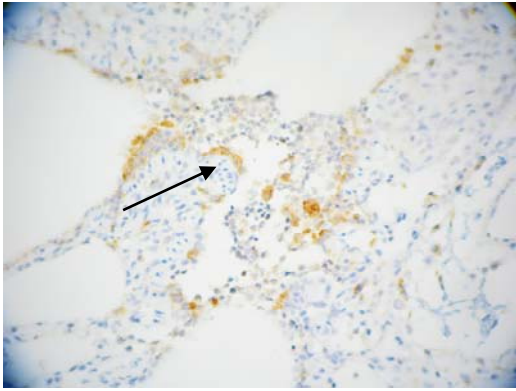
Trong tổng số 13 mẫu tiến hành phân lập virus của 5 lợn nái mắc PRRS, 10 mẫu có bệnh tích tế bào ở mức độ khác nhau, 3 mẫu không có bệnh tích tế bào. Như vậy, sự có mặt của virus ở các cơ quan, bộ phận của lợn bệnh là không giống nhau. Điều này cũng giải thích nguyên nhân tại sao khi tiến hành nhuộm hoá miễn dịch các mẫu block cho kết quả dương tính mà khi phân lập virus lại âm tính. Như vậy, sự tập trung virus ở các cơ quan và ở mỗi thời điểm bệnh là khác nhau.

Trong các mẫu bệnh phẩm phân lập thì bệnh tích tế bào xuất hiện sớm nhất sau 48h phân lập và sau 84h tế bào bị phá huỷ hoàn toàn. Mẫu phổi cho khả năng phân lập virus rất cao. Điều này giải thích cho những biến đổi đại thể chủ yếu ở lợn mắc PRRS là hiện tượng viêm phổi do virus tập trung ở phổi với số lượng lớn và phá huỷ nghiêm trọng chức năng của phổi vì đích tấn công của virus là các đại thực bào phế nang, tại đây chúng nhân lên và phá huỷ các tế bào này gây nên bệnh tích đặc trưng ở phổi và một lượng lớn tế bào đại thực bào trong nang phổi bị virus xâm nhiễm nên dễ dàng quan sát CPE khi phân lập virus từ phổi. Kết quả của nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Murakami và cs. (1994), Shimizu và cs. (1994). Sau khi tiến hành phân lập được virus PRRS, nghiên cứu thực hiện phản ứng hóa miễn dịch tế bào với kháng thể đặc hiệu kháng virus PRRS để khẳng định bệnh tích tế bào thu được là do virus PRRS gây nên và kết quả của các mẫu virus thu được đều cho kết quả hoá miễn dịch tế bào dương tính với virus PRRS (Hình 7 và 8).

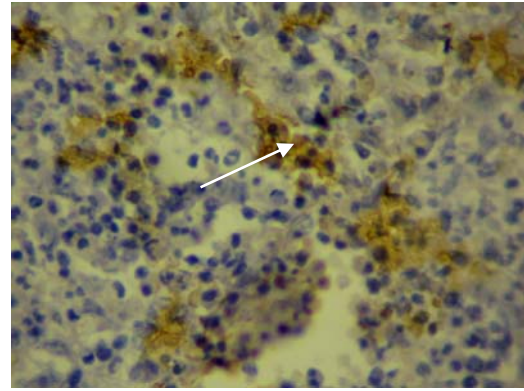
**Bảng 3. Kết quả nhuộm hoá mô miễn dịch**

STT	Kí hiệu	Phổi		Hạch phổi		Tử cung	
		Block 1	Block 2	Block 1	Block 2	Block 1	Block 2
1	N1	+	+	+	+	+	+
2	N2	+	+	-	+	+	+
3	N3	+	+	+	+	-	-
4	N4	-	+	+	+	-	-
5	N5	-	+	-	+	-	-

+ Có virus - Không có virus



Hình 5. Virus tập trung ở phổi



Hình 6. Virus tập trung ở hạch phổi

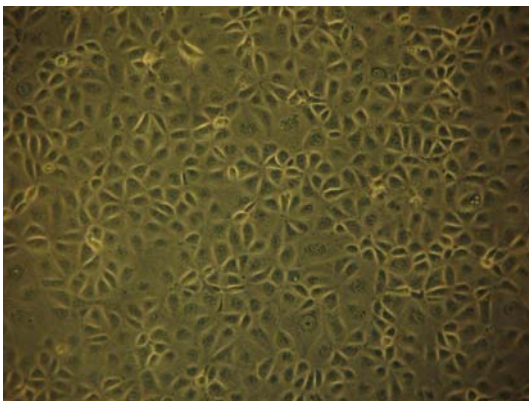
**Bảng 4. Kết quả phân lập virus PRRS trên môi trường tế bào Marc 145**

STT	Kí hiệu	Bệnh phẩm	CPE (Cytopathology effect)				
			36h*	48h	60h	72h	84h
1	N1	Phổi	-	10%**	70%	100%	
		Hạch phổi	-	5%	60%	80%	100%
		Tử cung	-	-	-	-	-
2	N2	Phổi	-	10%	75%	100%	
		Hạch phổi	-	-	-	-	-
		Tử cung	-	5%	60%	80%	100%
3	N3	Phổi	-	15%	90%	100%	
		Hạch phổi	-	-	-	-	-
		Phổi	-	15%	85%	100%	
4	N4	Hạch phổi	-	10%	75%	100%	
		Tử cung	-	5%	40%	85%	100%
		Phổi	-	5%	50%	80%	100%
5	N5	Hạch phổi	-	15%	85%	100%	

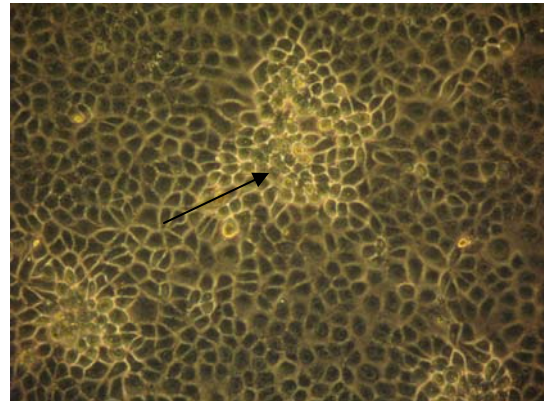
Chú thích : - Không có bệnh tích

\* : số giờ sau gây nhiễm

\*\* : bệnh tích tế bào so với tổng số diện tích đáy bình



Hình 7. Tế bào Marc 145 bình thường



Hình 8. CPE từ mẫu lợn mắc PRRS

#### 4. KẾT LUẬN

Kỹ thuật bệnh lý và hoá mô miễn dịch cho phép chẩn đoán chính xác 05 lợn nái mắc hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp. Đã phân lập được virus PRRS từ các mẫu bệnh phẩm của lợn nái thu thập được. Tế bào Marc 145 là tế bào thích hợp để phân lập virus PRRS, virus nhân lên nhanh trong tế bào và gây bệnh tích điển hình. Bệnh tích tế bào được biểu hiện là các tế bào co cụm lại với nhau chồi lên khỏi đáy bình. Tế bào Marc 145 bị PRRSV phá huỷ trung bình sau 48h gây nhiễm, đạt mức độ cao nhất sau 72h và bị phá huỷ muộn nhất là 84h.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Bá Hiên, Huỳnh Thị Mỹ Lệ (2007). “Một số hiểu biết về virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản của lợn”, Hội thảo Hội chứng rối loạn hô hấp - sinh sản và bệnh liên cầu khuẩn ở lợn, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
- Nguyễn Hữu Nam, Nguyễn Thị Lan (2007). “Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản”, Hội thảo Hội chứng rối loạn hô hấp - sinh sản và bệnh liên cầu khuẩn ở lợn, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
- Benfield D.A., Nelson E., Collins J.E., Harris L., Goyal S.M., Bobinson D., Christianson T.T., Morrison R.B., Gorcyca D., Chladek D., (1992). “Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR2332)”. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4, pp. 127–133.
- Lunney J.K., Benfield D.A., Rowland R.R., (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: An update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Journal of Virus Research* 7, pp. 286. Oct 14.
- Murakami Y, Kato A. (1994). “Isolation and serological characterization of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) virus from pigs with reproductive and respiratory disorders in Japan”, *J Vet Med Sci* 56, pp. 891- 894.
- Shimuzi M, Yamada S. (1994). “Isolation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) virus from Heko – Hekeo disease of pigs. *J Vet Med Sci* 56, pp. 389 - 391.
- Wensvoort G., Terpstra C., Pol JMA, (1991). “Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus”, *The Veterinary Quarterly*, vol. 13, No. 3, pp. 121-130, Jul.
- Yi J, Liu, C., Molecular characterization of porcine circovirus 2 isolated from diseased pigs co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 2010, 14 :286.