

KẾT QUẢ THIẾT LẬP PHẢN ỨNG TRUNG HÒA PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS (PEDV) SỬ DỤNG CHỦNG THỰC ĐỊA PHÂN LẬP TẠI MIỀN BẮC

Nguyễn Thị Bích^{1*}, Trần Văn Khánh¹, Nguyễn Thanh Ba¹, Chu Thị Thanh Hương²

¹Công ty TNHH Dược Hanvet
²Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Bichvn8078@gmail.com

Ngày nhận bài: 18.05.2020

Ngày chấp nhận đăng: 23.06.2020

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm thiết lập phản ứng trung hòa sử dụng chủng virus thực địa để làm công cụ đánh giá khả năng bảo hộ của vaccin chống lại các chủng PEDV gây bệnh lưu hành tại Việt Nam. Bằng cách lựa chọn môi trường DMEM không chứa huyết thanh bào thai bê (FBS), không chứa trypsin để pha mẫu phản ứng, pha hỗn dịch virus, lựa chọn môi trường duy trì chứa 8µg trypsin/ml đã tối ưu được quy trình trung hòa virus, tối ưu cách đánh giá kháng thể trung hòa bằng phương pháp nhuộm hóa miễn dịch trên tế bào một lớp, kết quả thí nghiệm cho thấy phản ứng trung hòa virus thực địa có độ nhạy 87,46% và độ đặc hiệu 98,18% khi so sánh với phản ứng ELISA phát hiện kháng thể đặc hiệu lớp IgG. Ứng dụng phản ứng trung hòa phát hiện biến động kháng thể trung hòa PEDV ở mẫu sữa đầu và huyết thanh của lợn nái và lợn con theo mẹ.

Từ khóa: Porcine epidemic diarrhea virus, phản ứng trung hòa virus.

Establishing Virus Neutralizing Test Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) using Isolated Field Strains in the North of Viet Nam

ABSTRACT

The study aimed to establish a virus neutralization test for field isolated virus, create a tool for assessing the protection of vaccines against pathogenic porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strains in Vietnam. By using DMEM medium free calf fetal serum (FBS) and without trypsin for dilution sample preparation/viral suspensions, and the maintenance medium containing 8 µg of trypsin/ml, the virus neutralization test and evaluation of neutralizing antibodies by immunochemical staining on monolayer cells were optimized. The results showed that the virus neutralization test for field isolated virus with the sensitivity of 87.46% and specificity 98.18% with compared to ELISA kit. It also pointed out that the virus neutralization test could be applied to detect fluctuation of PEDV neutralization antibody in colostrum and serum of mother and piglets.

Keywords: Porcine epidemic diarrhea virus, virus neutralizing test (VNT).

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) thuộc họ *Coronaviridae*, giống *Alphacoronavirus* là nguyên nhân gây tiêu chảy cấp và mất nước trầm trọng ở lợn (Debouck & Pensaert, 1980; Stevenson & cs., 2013). PEDV được phát hiện lần đầu tiên trên thế giới vào năm 1971 tại một ổ dịch tiêu chảy cấp ở Anh. Đến năm 1977 bệnh tiêu chảy trên lợn xảy ra nghiêm trọng tại Bỉ, chủng virus phân lập được với tên gọi CV777

(Pensaert & De Bouck, 1978). Dịch tiêu chảy do PEDV gây ra xảy ra rộng khắp ở châu Âu trong những năm 1970 đến năm 1980. Từ năm 1980 đến năm 1990, số ổ dịch giảm dần ở châu lục này. Năm 2013 bệnh lần đầu tiên bùng phát ở châu Mỹ với báo cáo dịch đầu tiên ở nước Mỹ (Wang & cs., 2014), sau đó dịch lan nhanh các nước có biên giới với Mỹ. Phân tích di truyền cho thấy hầu hết virus phân lập ở châu Á và châu Mỹ thuộc nhóm mới nổi G2b, nằm ở nhánh khác hoàn toàn với chủng virus thuộc nhóm G1 thường dùng chế

vaccin trước đó (Lee, 2015). Việt Nam là nước xuất hiện bệnh PED muộn so với các nước trong khu vực. PED chính thức được phát hiện từ năm 2008, được xác định có quan hệ gần với các chủng Trung Quốc (Toan & cs., 2011). Có 2 nhóm di truyền của PEDV ở miền Bắc và Bắc Trung Bộ, trong đó nhóm mới nổi G2 chiếm ưu thế (Nguyễn Trung Tiến & cs., 2017)). PEDV là một virus luôn biến đổi, kể từ năm 2010, đã có sự biến đổi của PEDV tại thực địa so với các chủng vaccin (Sun & cs., 2012; Stevenson & cs., 2013; Lee & Lee, 2014; Bongkyun Park & Song, 2016). Do đó, dù chương trình dùng vaccin PED đầy đủ trên lợn ở các cơ sở chăn nuôi, nhưng dịch tiêu chảy do PEDV vẫn xảy ra. Ở Việt Nam, cho đến thời điểm hiện tại, vaccin thương mại chủ yếu là vaccin vô hoạt hoặc nhược độc dựa vào các chủng thuộc nhóm cổ điển như: CV777, DR13, SM98.

Protein S của PEDV có vai trò kích thích cơ thể vật chủ sinh kháng thể trung hòa, đồng thời giúp virus tiếp cận và xâm nhập vào tế bào vật chủ (Bosch & cs., 2003; D. Song & Park, 2012). Do đó, phản ứng trung hòa là phương pháp gián tiếp đánh giá tình trạng miễn dịch chống lại PEDV (Oh & cs., 2005), với ngưỡng kháng thể trung hòa $5 \log_2$ có khả năng bảo hộ chống lại công cường độc (Clement & cs., 2016). So với nhóm cổ điển, các chủng PEDV thuộc nhóm mới nổi được chứng minh đề kháng cao với interferon và không bị trung hòa bởi kháng thể kích thích tạo ra bởi chủng PEDV cổ điển (Shin & Park, 2019). Các kết quả nghiên cứu trên cho thấy đáp ứng miễn dịch tạo ra chỉ có khả năng bảo hộ đồng chủng. Do đó tương quan giữa bảo hộ và hiệu giá kháng thể trung hòa cần dựa trên chủng virus hiện lưu hành ở thực địa. Để góp phần xây dựng công cụ giám sát lưu hành huyết thanh học và đánh giá khả năng bảo hộ của vắc xin, phản ứng trung hòa PEDV với chủng virus phân lập thực địa cần được thiết lập.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Chủng PEDV 0118 phân lập từ lợn con theo mẹ mắc tiêu chảy cấp do phòng thí nghiệm

Công ty Hanvet cung cấp. Chủng virus này đã giám định là PEDV, thuộc nhóm di truyền G2 bằng cặp môi đặc hiệu genogroup (Zhao & cs., 2014). Chủng PEDV 0118 còn được khẳng định không tạp TGEV, Rotavirus theo phương pháp và trình tự môi mô tả trước đây (Song & cs., 2006). Một số đặc tính sinh học của chủng PEDV 0118 là: có hiệu giá $10^{6.1}$ TCID₅₀/ml, có độc lực khi gây chết 5/5 lợn 2 ngày tuổi với liều $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml/ con theo đường uống. Chủng virus được chia nhỏ và bảo quản ở -80°C . Chuẩn độ ngược (back titration) ở mỗi lần thực hiện phản ứng nhằm đảm bảo hiệu giá virus thực dùng dao động xung quanh 100 TCID₅₀/100 μl .

- Huyết thanh lợn (nái, lợn con theo mẹ) ở trạng âm tính và dương tính PEDV, sữa đầu của lợn nái;

- Dòng tế bào Vero (ATCC - CCL-81);

- Môi trường: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM- Gibco), huyết thanh bào thai bò (FBS-Gibco); Tryptose Phosphate Broth (TBP-Merck); Yeast extract (YE-Merck); Trypsin 1: 250 (Gibco);

- Sinh phẩm, hóa chất dùng nhuộm IPMA: anti- PEDV monoclonal antibody (Median Diagnostics Inc), HRP- conjugated goat anti- mouse IgG (US Biological); N, N-Dimethylformamide (Sigma); cơ chất 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC- Sigma);

- PBS 1X, pH 7,2;

- Bộ kit tổng hợp cDNA (MMLV reverse transcriptase, Promega, M1705), kit PCR (GoTaq G2 Hot Start Master, Promega, M7423); các bộ môi đặc hiệu giám định genogroup PEDV, phát hiện TGEV, Rotavirus được lấy theo nghiên cứu trước đây (Song & cs., 2006; Zhao & cs., 2014);

- Bộ kit ELISA (được thiết lập theo tiêu chuẩn cơ sở) phát hiện kháng thể kháng protein S của PEDV;

- Dụng cụ và thiết bị: đĩa nuôi tế bào 96 giếng, đĩa làm phản ứng ELISA, tủ nuôi ấm 5% CO₂, kính hiển vi soi ngược, máy đọc ELISA; máy PCR.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết lập phản ứng trung hòa PEDV

Phương pháp trung hòa virus được thiết lập với sự điều chỉnh từ các tài liệu đã mô tả trước đây (Paudel & cs., 2014b; Collin & cs., 2015; Clement & cs., 2016). Phản ứng được thiết lập dựa trên loạt huyết thanh lợn dương tính và huyết thanh âm tính với kháng thể kháng PEDV. Các mẫu này được chọn từ bộ huyết thanh theo tiêu chuẩn cơ sở. Cụ thể, huyết thanh được thu thập ở lợn từ 2 trang trại: một trang trại lợn không có tiền sử bệnh tiêu chảy do virus, xét nghiệm virus học âm tính với PEDV; trang trại còn lại đã từng mắc PED, có kết quả xét nghiệm dương tính với PEDV bằng phương pháp RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu được tả trước đây (Song & cs., 2006). Mẫu huyết thanh được bất hoạt ở 56°C/30 phút và khẳng định chắc chắn dương tính hoặc âm tính kháng thể kháng PEDV bằng phản ứng ELISA cơ sở.

Huyết thanh cần xác định hiệu giá kháng thể trung hòa được pha loãng liên tiếp theo cơ số 2. Mỗi độ pha loãng được trộn với thể tích virus cố định (hiệu giá 100 TCID₅₀/100µl) theo tỷ lệ 1:1. Ủ huyền dịch huyết thanh: virus ở 37°C/5% CO₂ trong vòng 1 giờ 30 phút. Chuyển 100µl hỗn dịch huyết thanh: virus vào tế bào Vero 1 lớp (đã được rửa 3 lần bằng PBS⁻ 1X). Sau thời gian hấp phụ 1 giờ 30 phút, hút bỏ dịch huyền dịch, rửa tế bào 3 lần và thêm 100µl DMEM duy trì có TPB (0,3%), YE (0,02%) và trypsin (8 µg/ml).

Xác định giếng có kháng thể trung hòa dương tính bằng phương pháp hóa miễn dịch, phản ứng miễn dịch trên tế bào một lớp, cố định thảm tế bào bằng dung dịch PBS chứa 10% Formalin và 1% NP40, sau đó thêm kháng thể đặc hiệu PEDV (anti- PEDV monoclonal antibody - Median Diagnostics Inc), rửa đĩa phản ứng, thêm kháng thể cộng hợp (HRP-conjugated goat anti- mouse IgG (US Biological), thêm cơ chất AEC. Tế bào nhiễm virus đặc hiệu khi quan sát qua kính hiển vi soi ngược nguyên sinh chất của tế bào bắt màu đỏ của cơ chất AEC. Đọc kết quả trung hòa theo mô tả trước đây (Paudel & cs., 2014a), dựa vào mức độ giảm 90% số tế bào/số cụm tế bào nhiễm

virus so với đối chứng âm. Hiệu giá kháng thể trung hòa là số nghịch đảo của độ pha loãng cao nhất mà ở độ pha loãng đó dương tính. Mẫu được coi dương tính khi hiệu giá kháng thể trung hòa ≥ 8 (Chen & cs., 2016). Những báo cáo khác thấy rằng 90% số lợn nghiên cứu có hiệu giá kháng thể trung hòa ≥ 20 , nên ngưỡng dương được xác định hiệu giá kháng thể ≥ 20 (Collin & cs., 2015; Chen & cs., 2016).

2.2.2. Phương pháp ELISA phát hiện kháng thể kháng PEDV

Để làm cơ sở tính độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng trung hòa, nghiên cứu này chọn phản ứng ELISA (phát hiện kháng thể lớp IgG) làm tham chiếu. Kít ELISA đã thiết lập theo tiêu chuẩn cơ sở (ELISA cơ sở) được đánh giá độ nhạy/đặc hiệu với kít ELISA thương mại SwinecheckPED indirect, BioVet (không trình bày). Các bước thực hiện tóm tắt như sau: chủng PEDV 0118 cường độc phủ đĩa ở hiệu giá 10^{4,2} TCID₅₀/ml trong coating buffer (pH = 9,6) ở 4°C trong 12 giờ; huyết thanh chẩn đoán được pha 1/200 trong sữa tách bơ 3% - PBS - Tween 20 0,05%; kháng thể kháng lợn gắn enzyme được pha 1/1.200 trong sữa tách bơ 3% - PBS - Tween 20 0,05%. Giữa các bước, ủ ở nhiệt độ 37°C, trong vòng 60 phút; rửa 3 lần bằng dung dịch PBS - Tween 20 0,05% để loại bỏ các thành phần không đặc hiệu. Mẫu có giá trị ngưỡng OD₄₅₀ <0,225 được xác định âm tính với kháng thể kháng PEDV.

2.2.3. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của phản ứng trung hòa virus

Phản ứng ELISA được dùng làm tiêu chuẩn để đối chiếu kết quả của phương pháp trung hòa virus được thiết lập. Cụ thể, mỗi mẫu huyết thanh sẽ được phân tích lần lượt bằng phản ứng ELISA cơ sở và phản ứng trung hòa virus. Mối tương quan giữa giá trị OD₄₅₀ của ELISA cơ sở và hiệu giá trung hòa được xác định bằng giá trị R (Pearson Correlation Coefficient), tính theo dẫn liệu từ nguồn: <https://www.socscistatistics.com/tests/pearson/default2.aspx>. Cách tính độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp được trình bày ở bảng 1.

Kết quả thiết lập phản ứng trung hòa Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) sử dụng chủng thực địa phân lập tại miền Bắc

Bảng 1. Cách tính độ nhạy, độ đặc hiệu của phản ứng trung hòa

Kết quả phản ứng trung hòa	Kết quả ELISA cơ sở	
	Số mẫu dương tính	Số mẫu âm tính
Số mẫu dương tính	TP	FP
Số mẫu âm tính	FN	TN

Ghi chú: TP: dương tính thật, FP: dương tính giả, TN: âm tính thật, FN: âm tính giả

Bảng 2. Hiệu giá trung hòa ở các môi trường bổ sung trypsin với nồng độ khác nhau

Loại huyết thanh	Nồng độ trypsin ở mỗi loại môi trường			
	Môi trường duy trì	Môi trường pha virus/ huyết thanh		
		0 µg/ml	8 µg/ml	10 µg/ml
Huyết thanh dương	0 µg/ml	0	KXD	KXD
Huyết thanh âm		0	0	0
Huyết thanh dương	8 µg/ml	6 log ₂	KXD	KXD
Huyết thanh âm		0	(bong 10%)	(bong 30%)
Huyết thanh dương	10 µg/ml	6 log ₂	KXD	KXD
Huyết thanh âm		0	(bong 20%)	(bong 50%)

Ghi chú: KXD: Không xác định được hiệu giá kháng thể do thảm tế bào bị co tròn và bong hoặc CPE xuất hiện không theo quy luật.

Xác định độ nhạy (phát hiện đúng khi có kháng thể) theo công thức: $S_n = TP / (TP + FN) \times 100$; xác định độ đặc hiệu (không phát hiện khi không có mặt kháng thể) theo công thức $S_p = TN / (TN + FP) \times 100$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tối ưu môi trường của phản ứng trung hòa

Phản ứng trung hòa sử dụng chủng PEDV 0118 phân lập thực địa được thiết lập dựa trên cơ sở các thí nghiệm: tối ưu môi trường pha loãng virus, pha loãng huyết thanh; tối ưu môi trường duy trì tế bào Vero khi nhiễm hỗn dịch trung hòa. Bảng 2 trình bày kết quả tối ưu nồng độ trypsin của môi trường dùng trong phản ứng.

Kết quả cho thấy môi trường dùng pha virus/huyết thanh chẩn đoán có trypsin (8 µg/ml hoặc 10 µg/ml) đều dẫn tới hiện tượng tế bào trong giếng co tròn và bong từ 10-50%. Ngược lại, môi trường pha virus/huyết thanh không có trypsin, thảm tế bào không bong, hiệu giá trung hòa virus của mẫu huyết thanh chuẩn dương,

chuẩn âm lần lượt là 6 log₂ và 0. Bảng 2 còn cho biết lượng trypsin trong môi trường duy trì (8 µg/ml hoặc 10 µg/ml) không làm thay đổi hiệu giá trung hòa của mẫu huyết thanh và thảm tế bào ổn định. Hàm lượng trypsin này phù hợp với hàm lượng trypsin trong môi trường phân lập virus trên tế bào Vero mà các tác giả trước đã sử dụng (Chung & cs., 2015; Nguyễn Thị Hoa & cs., 2018).

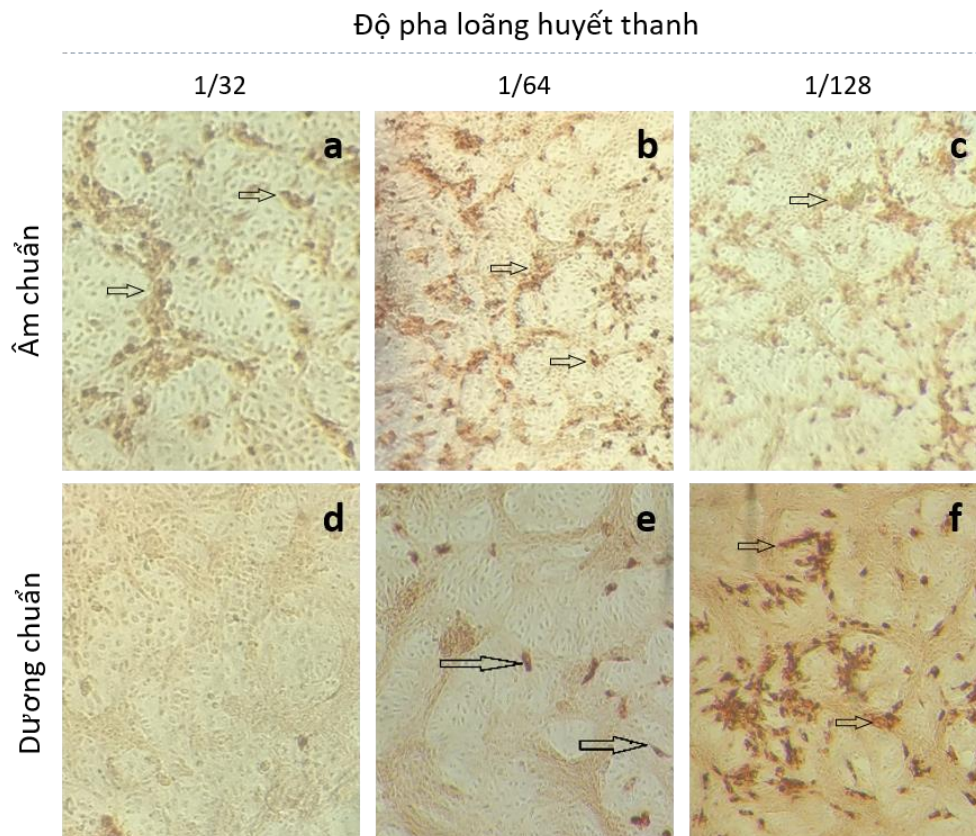
Nghiên cứu trước đây đã khẳng định trong môi trường duy trì để phân lập virus không thể thiếu trypsin trong vòng 25 đời đầu (Hofmann & Wyler, 1988). Nhưng tế bào có thể bị co và bong vì sự có mặt của trypsin và không thể giúp virus nhân lên. Đã có nhiều công bố khoa học ứng dụng phản ứng trung hòa virus nhưng không nêu rõ thành phần môi trường dùng cho mỗi bước của phản ứng (Paudel & cs., 2014a; Clement & cs., 2016; Song & cs., 2016). Trong một nghiên cứu được công bố, môi trường DMEM bổ sung 1 µg/ml trypsin được dùng chung để pha virus/huyết thanh và là môi trường duy trì (Lee & cs., 2018). Tuy nhiên, chủng virus dùng trong nghiên cứu kể trên đã thích nghi cao độ trên môi trường tế

bào (tiếp đời 70 lần), do đó ít phụ thuộc vào trypsin. Ngược lại, nghiên cứu này dùng chủng PEDV có số lần tiếp đời thấp (đời 7), nên đòi hỏi lượng trypsin cao gấp 10 lần mới giúp xác định được kết quả của phản ứng một cách rõ ràng. Khác với các virus khác thuộc nhóm *Alphacoronavirus* của họ *Coronaviridae*, trypsin không đóng vai trò hoạt hóa PEDV trước khi virus gắn vào tế bào vật chủ hoặc tế bào Vero, mà trypsin chỉ có vai trò giúp virus xâm nhập khi PEDV đã tiếp xúc với thụ thể của tế bào (Park & cs., 2011). Kết quả thí nghiệm của nhóm tác giả Park & cs., 2011 cho thấy, virus hình thành thể hợp bào và tăng hiệu giá virus khi virus hấp phụ vào tế bào Vero trong môi trường không có trypsin mà chỉ có trypsin bổ sung trong môi trường duy trì (Park & cs., 2011). Một lý do nữa mà trypsin không thể bổ sung vào môi trường pha virus và huyết thanh vì trypsin bị kìm chế,

bị ngăn cản bởi hoạt động của huyết thanh chẩn đoán khi nồng độ pha loãng mẫu thấp (Oh & cs., 2005; Paudel & cs., 2014b). Những điều này lý giải việc chỉ cần có trypsin trong giai đoạn duy trì tế bào nhiễm mà không cần bổ sung trypsin trong giai đoạn tương tác giữa virus và kháng thể đặc hiệu là phù hợp.

3.2. Kết quả thiết lập phương pháp đọc kết quả phản ứng trung hòa

PEDV tạo ra bệnh tích khó quan sát bằng kính hiển vi soi ngược ở các lần tiếp đời thấp. Nhằm tăng tính chính xác, thay vì quan sát bệnh tích tế bào, nghiên cứu dùng kỹ thuật hóa miễn dịch trên tế bào 1 lớp (IPMA) để xác định giếng có/không có virus nhân lên và làm căn cứ xác định hiệu giá trung hòa (dựa vào mức độ giảm 90% số tế bào/số cụm tế bào nhiễm virus so với đối chứng âm).



Ghi chú: Huyết thanh âm chuẩn (a-c) và huyết thanh dương chuẩn (d-f) pha loãng tăng dần từ 32, 64 và 128 lần. Tế bào nhiễm PEDV bắt màu của cơ chất (mũi tên). Độ pha loãng huyết thanh cao nhất có khả năng ức chế 90% số tế bào nhiễm virus (so với đối chứng) được xác định là hiệu giá trung hòa (e).

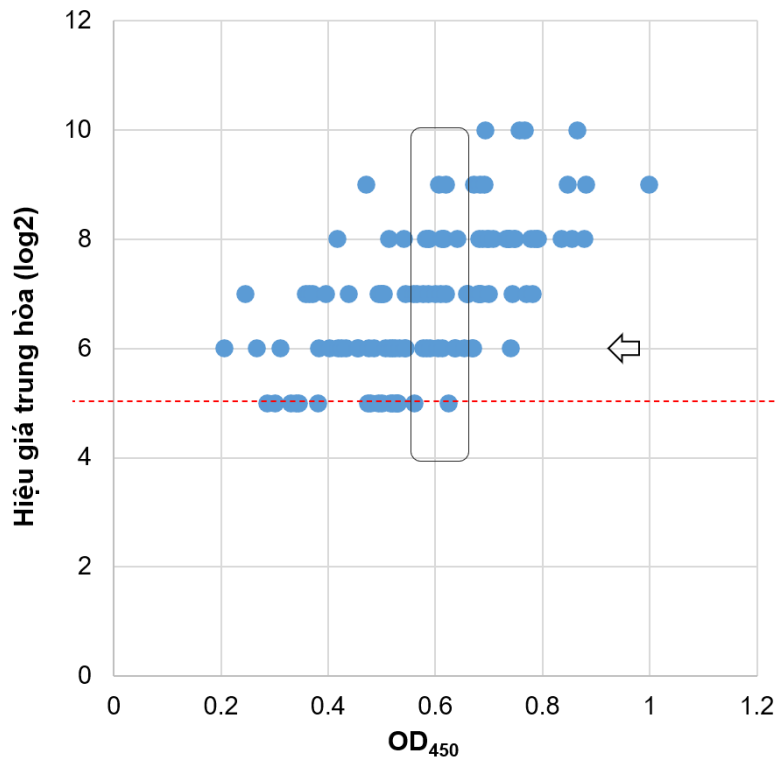
Hình 1. Kết quả đọc phản ứng trung hòa PEDV bằng phương pháp IPMA

Kết quả ở hình 1 cho thấy cách đọc phản ứng bằng phương pháp nhuộm IPMA phân biệt rõ giữa mẫu không có kháng thể trung hòa (a-c) và mẫu có kháng thể trung hòa dương tính (d-e). Ở mẫu huyết thanh âm chuẩn, số lượng tế bào nhiễm PEDV (mũi tên) không có sự khác biệt đáng kể giữa các độ pha loãng. Ở mẫu huyết thanh dương chuẩn, theo chiều tăng của độ pha loãng huyết thanh (tương ứng với hàm lượng kháng thể trung hòa giảm dần), số lượng tế bào nhiễm virus (mũi tên) tăng dần.

Trong quá trình nhân lên của virus trong môi trường tế bào Vero, PEDV gây bệnh tích điển hình là thể hợp bào (Hofmann & Wyler, 1988). Dù vậy, do lượng virus dùng cho phản ứng trung hòa tương đối nhỏ (30-300 TCID₅₀/giếng) việc đọc kết quả của phản ứng thông qua bệnh tích tế bào gặp khó khăn. Hầu hết các tác giả đọc phản ứng bằng cách nhuộm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (De Arriba & cs., 1995; Song & cs., 2016) hoặc nhuộm hóa miễn dịch (Paudel & cs., 2014a).

3.3. Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng trung hòa

Độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng trung hòa mới được thiết lập và tối ưu được tính toán trên cơ sở so sánh với kết quả của phản ứng ELISA cơ sở. Kết quả biểu diễn mối tương quan giữa hiệu giá trung hòa và giá trị OD₄₅₀ được trình bày ở hình 2. Kết quả cho thấy ở một hiệu giá trung hòa cố định, giá trị OD₄₅₀ có khoảng biến động lớn, ví dụ giá trị OD₄₅₀ dao động từ 0,21-0,74 đối với nhóm gồm 30 mẫu có hiệu giá trung hòa là 6 log₂ (mũi tên, Hình 2). Ở chiều ngược lại, phản ứng trung hòa (liên quan tới khả năng bảo hộ chống lại công cường độc) thể hiện ưu điểm hơn so với phản ứng ELISA. Ví dụ, phản ứng trung hòa cho biết nhóm mẫu huyết thanh có giá trị OD₄₅₀ = 0,6 không có tính đồng nhất về hiệu giá trung hòa, biến động từ 5 log₂ đến 9 log₂ (vùng đóng khung, Hình 2).



Ghi chú: Mỗi mẫu huyết thanh (biểu diễn bởi 1 chấm tròn) được xét nghiệm bằng phản ứng trung hòa và ELISA để xác định hiệu giá trung hòa và giá trị OD₄₅₀. Mẫu được đánh giá là có kháng thể trung hòa nếu có hiệu giá tối thiểu là 5 log₂ (giới hạn bởi đường nét đứt).

Hình 2. Tương quan giữa hiệu giá trung hòa và giá trị OD

Bảng 3. Độ nhạy, độ đặc hiệu của phản ứng trung hòa

Kết quả trung hòa	Kết quả ELISA		Tổng hàng
	Dương tính	Âm tính	
Dương tính ($\geq 5 \log_2$)*	125	1	126
Âm tính ($< 5 \log_2$)	18	54	72
Tổng cột	143	55	198

Ghi chú: (*) mẫu huyết thanh ở độ pha loãng $>1/20$ làm giảm 90% số tế bào nhiễm PEDV giảm so đối chứng âm được xác định là có kháng thể trung hòa (Clement và cs., 2016). Trong nghiên cứu này lấy giá trị ngưỡng dương tính kháng thể trung hòa là $\geq 5 \log_2$.

Từ công thức tính (Pearson Correlation Coefficient Calculator), đã xác định có tương quan tỷ lệ thuận giữa giá trị OD_{450} và hiệu giá kháng thể trung hòa (giá trị Pearson's R = 0,61). Kết quả này là phù hợp với một số nghiên cứu trước đây khi đều xác định được tương quan giữa kết quả phát hiện kháng thể kháng PEDV bằng phản ứng trung hòa và phản ứng ELISA (Oh & cs., 2005; Paudel & cs., 2014b; Hao & cs., 2017). Mặc dù có ý nghĩa thống kê ($P < 0,00001$) nhưng tương quan kể trên chỉ ở mức trung bình. Điều này được giải thích là do trong thành phần huyết thanh của lợn có nhiều lớp kháng thể trung hòa PEDV (ví dụ như IgG, IgA) nhưng phản ứng ELISA dùng trong nghiên cứu này chỉ phát hiện được lớp kháng thể IgG (Oh & cs., 2005). Trong các nghiên cứu tiếp theo nhằm hoàn thiện phản ứng trung hòa virus, cần sử dụng thêm các kỹ thuật phát hiện được lớp kháng thể đặc hiệu IgG và IgA (hoặc sIgA tiết qua sữa), ví dụ như kỹ thuật alphaLISA (Kimpston-Burkgren & cs., 2020). So sánh kết quả phát hiện mẫu âm tính/dương tính với kháng thể kháng PEDV được tóm tắt ở bảng 3.

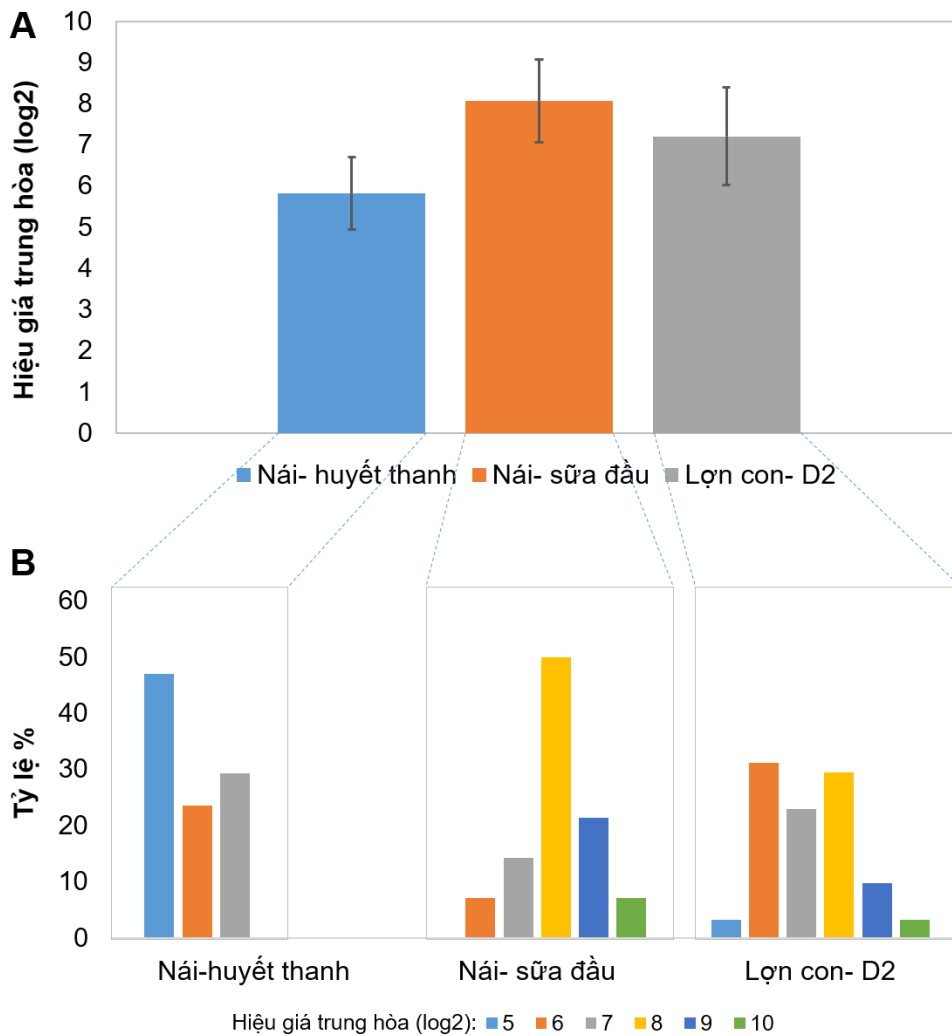
Bảng 3 cho biết phần lớn các mẫu (125/198 mẫu dương tính, 54/198 âm tính) đều có kết quả phát hiện giống nhau giữa hai phương pháp. Dựa vào công thức tính, độ nhạy của phản ứng trung hòa so với phản ứng ELISA cơ sở là 87,46% và độ đặc hiệu là 98,18%. Sự không phù hợp hoàn toàn giữa kết quả của phản ứng trung hòa và phản ứng ELISA đã được chỉ ra ở một vài nghiên cứu tương tự (Oh & cs., 2005; Okda & cs., 2015). Đặc điểm này cũng quan sát được ở nghiên cứu này: có 18 mẫu được xác định là âm tính giả (kết quả phát hiện kháng thể trung hòa so với kết quả phát hiện kháng thể lớp IgG tổng

số bằng ELISA). Sự khác biệt trên có thể do một số nguyên nhân. Thứ nhất, phản ứng trung hòa phát hiện kháng thể làm mất hoạt tính nhiễm của virus (kháng thể trung hòa). Trong khi đó, protein bề mặt của virus (ví dụ như protein S) lại bao gồm các epitope kích thích sản sinh kháng thể trung hòa và kháng thể không có khả năng trung hòa virus (Song & cs., 2016). Ngoài ra, thời điểm xuất hiện kháng thể trung hòa và đạt hiệu giá cao nhất thường chậm hơn so với kháng thể không có tác dụng trung hòa virus (Okda & cs., 2015; Thomas & cs., 2015).

3.4. Kết quả ứng dụng phản ứng trung hòa với mẫu thực địa

Kết quả ứng dụng phản ứng trung hòa trong khảo sát kháng thể của các cặp lợn nái - lợn con (sau bú sữa đầu) ở một số trang trại được trình bày ở hình 3. Hình 3A cho biết phản ứng trung hòa có thể phát hiện được kháng thể trung hòa ở 2 loại mẫu khác nhau (huyết thanh - sữa đầu). Trong cùng nhóm lợn, có thể thấy kháng thể trong sữa non cao hơn hẳn so kháng thể trong huyết thanh mẹ ($P < 0,05$). Đặc điểm trên phù hợp với kết quả đã công bố (Clement & cs., 2016) và phản ánh đặc điểm sinh lý tiết sữa với hàm lượng IgG, IgM và IgA ở sữa đầu luôn cao hơn tối thiểu 2 lần so với hàm lượng trong máu lợn nái (Porter, 1969). Khi tổng hợp kết quả theo nhóm lợn, dễ dàng thấy phản ứng trung hòa mới thiết lập còn phát hiện được sự biến động về hiệu giá kháng thể trung hòa ở mỗi nhóm lợn (Hình 3B), đặc biệt là nhóm lợn con theo mẹ với khoảng biến động từ $5 \log_2$ - $10 \log_2$. Đây có thể do lợn nái có hàm lượng kháng thể thấp và/hoặc mức tiếp nhận kháng thể truyền qua sữa đầu không đồng đều giữa các lợn con.

Kết quả thiết lập phản ứng trung hòa Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) sử dụng chủng thực địa phân lập tại miền Bắc



Ghi chú: Hiệu giá kháng thể trung hòa ở nhóm lợn nái và lợn con của chúng (A). Mẫu huyết thanh và sữa đầu được lấy ở cùng nhóm lợn nái. Mẫu huyết thanh của lợn con thu thập 2 ngày sau khi bú sữa đầu (D2). Hiệu giá kháng thể trung hòa biểu diễn cho từng nhóm mẫu (B).

Hình 3. Biến động hiệu giá kháng thể trung hòa ở các nhóm mẫu

Như vậy, các kết quả nêu trên đã chứng tỏ phản ứng trung hòa được thiết lập thành công. Nghiên cứu về huyết thanh học, nghiên cứu trước đây đã báo cáo, ứng dụng phản ứng trung hòa đánh giá khả năng kháng chéo giữa huyết thanh kháng dòng mới nổi có độc lực thấp (S- INDEL) với virus đồng chủng cao hơn hiệu giá kháng thể trung hòa với virus dị chủng dòng mới nổi có độc lực cao (non- S INDEL) 4 lần, trong khi đó, giữa huyết thanh kháng PEDV của dòng CV777 cổ điển với virus đồng chủng cao hơn hiệu giá kháng thể trung hòa dị chủng (dòng mới nổi) 16 lần (Chen & cs., 2016). Mặc dù vậy, cần ứng dụng

phản ứng trung hòa với một dung lượng mẫu lớn hơn để tiếp tục đánh giá chất lượng cũng như hoàn thiện các điểm yếu có thể được phát hiện trong quá trình thực hiện.

4. KẾT LUẬN

Đã thiết lập được phản ứng trung hòa dùng chủng PEDV thực địa với độ nhạy 87,46% và độ đặc hiệu là 98,18%. Phản ứng trung hòa đã phát hiện được và phản ánh đúng đặc điểm hiệu giá kháng thể trung hòa trong sữa đầu luôn cao hơn ở huyết thanh của lợn nái.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bosch B.J., Van Der Zee R., De Haan C.A. & Rottier P.J. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex, *Journal of virology*. 77(16): 8801-8811.
- Clement T., Singrey A., Lawson S., Okda F., Nelson J., Diel D., Nelson E.A. & Christopher-Hennings J. (2016). Measurement of neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in sow serum, colostrum, and milk samples and in piglet serum samples after feedback, *Journal of Swine Health and Production*. 24(3): 147-153.
- Chen Q., Thomas J.T., Giménez-Lirola L.G., Hardham J.M., Gao Q., Gerber P.F., Opriessnig T., Zheng Y., Li G. & Gauger P.C. (2016). Evaluation of serological cross-reactivity and cross-neutralization between the United States porcine epidemic diarrhea virus prototype and S-INDEL-variant strains, *BMC veterinary research*. 12(1): 70.
- Chung H.C., Nguyen V.G., Moon H.J., Lee J.H., Park S.J., Lee G.E., Kim H.K., Noh Y.S., Lee C.H., Goede D. & Park B.K. (2015). Isolation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus during Outbreaks in South Korea, 2013-2014, *Emerg Infect Dis*. 21(12): 2238-40.
- De Arriba M., Carvajal A., Lanza I., Rubio P. & Blanchard P. (1995). Development of an ELISA for the detection of antibody isotypes against porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) in sow's milk, *Proc. 3rd Congr. ESVV*. pp. 222-225.
- Collin E.A., Anbalagan S., Okda F., Batman R., Nelson E. & Hause B.M. (2015). An inactivated vaccine made from a US field isolate of porcine epidemic disease virus is immunogenic in pigs as demonstrated by a dose-titration, *BMC veterinary research*. 11(1): 62.
- Debouck P. & Pensaert M. (1980). Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777. *Am J Vet Res*. 41(2): 219-23.
- Kimpston-Burkgren K., Mora-Diaz J.C., Roby P., Bjustrom-Kraft J., Main R., Bosse R. & Gimenez-Lirola L.G. (2020). Characterization of the humoral immune response to porcine epidemic diarrhea virus infection under experimental and field conditions using an AlphaLISA platform, *Pathogens*. 9(3).
- Hao J., Zhang Y., Fang S., Wen Z., Zhang X., Xue C. & Cao Y. (2017). Evaluation of purified recombinant spike fragments for assessment of the presence of serum neutralizing antibodies against a variant strain of porcine epidemic diarrhea virus, *Virology*. 512(2): 307-316.
- Hofmann M. & Wyler R. (1988). Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture, *J Clin Microbiol*. 26(11): 2235-9.
- Lee C. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus, *Virology*. 531(1): 193.
- Lee S. & Lee C. (2014). Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US strains, South Korea, 2013, *Emerg Infect Dis*. 20(7): 1223-6.
- Lee S.H., Yang D.K., Kim H.H. & Cho I.S. (2018). Efficacy of inactivated variant porcine epidemic diarrhea virus vaccines in growing pigs, *Clin Exp Vaccine Res*. 7(1): 61-69.
- Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Thị Lan, Trương Quang Lâm, Trịnh Đình Thâu & Ngô Thị Hạnh (2018). Nghiên cứu phân lập và xác định một số đặc điểm sinh học của virus PED (Porcine epidemic diarrhea virus), *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 16(3): 257-267
- Nguyễn Trung Tiến, Vũ Thị Thu Hằng, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Nguyễn Bá Hiên & Lê Văn Phan (2017). Một số đặc điểm sinh học phân tử của virus gây ra dịch tiêu chảy cấp ở lợn (porcine epidemic diarrhea-PED) tại Quảng Trị, Thái Nguyên và Thái Bình từ năm 2013-2014, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 13(7): 1089-1100.
- Oh J.S., Song D.S., Yang J.S., Song J.Y., Moon H.J., Kim T.Y. & Park B.K. (2005). Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with serum neutralization test for serodiagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection, *J Vet Sci*. 6(4): 349-52.
- Okda F., Liu X., Singrey A., Clement T., Nelson J., Christopher-Hennings J., Nelson E.A. & Lawson S. (2015). Development of an indirect ELISA, blocking ELISA, fluorescent microsphere immunoassay and fluorescent focus neutralization assay for serologic evaluation of exposure to North American strains of Porcine Epidemic Diarrhea Virus, *BMC Vet Res*. 11(1): 180.
- Park B. & Song, D. (2016). Recent outbreaks and emergence of mutants of porcine epidemic diarrhea viruses (PEDV) in Korea, *Japanese Journal of Veterinary Research*. 64(Supplement 1): S25-S32.
- Park J.E., Cruz D.J. & Shin H.J. (2011). Receptor-bound porcine epidemic diarrhea virus spike protein cleaved by trypsin induces membrane fusion, *Arch Virol*. 156(10): 1749-56.
- Paudel S., Park, J.E., Jang H., Hyun B.H., Yang D.G. & Shin H.J. (2014a). Evaluation of antibody response of killed and live vaccines against porcine epidemic diarrhea virus in a field study, *Vet Q*. 34(4): 194-200.
- Paudel S., Park J.E., Jang H. & Shin H.J. (2014b). Comparison of serum neutralization and enzyme-linked immunosorbent assay on sera from porcine epidemic diarrhea virus vaccinated pigs, *Vet Q*. 34(4): 218-23.

- Pensaert M. & De Bouck P. (1978). A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine, *Archives of virology*. 58(3): 243-247.
- Porter P. (1969). Transfer of immunoglobulins IgG, IgA and IgM to lacteal secretions in the parturient sow and their absorption by the neonatal piglet, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. 181(2): 381-392.
- Shin H.J. & Park J.E. (2019). Newly isolated porcine epidemic diarrhea virus resistance to interferon and neutralizing antibody, *The Journal of Immunology*. 202(1 Supplement): 73.12.
- Song D. & Park B. (2012). Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*. 44(2): 167-75.
- Song D.S., Kang B.K., Oh J.S., Ha G.W., Yang J.S., Moon H.J., Jang Y.S. & Park B.K. (2006). Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus. *J. Vet Diagn Invest*. 18(3): 278-81.
- Song Q., Stone S., Drebes D., Greiner L.L., Dvorak C.M.T. & Murtaugh M.P. (2016). Characterization of anti-porcine epidemic diarrhea virus neutralizing activity in mammary secretions. *Virus Res*. 226: 85-92.
- Stevenson G.W., Hoang H., Schwartz K.J., Burrough E.R., Sun D., Madson D., Cooper V.L., Pillatzki A., Gauger P. & Schmitt B.J. (2013). Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 25(5): 649-654.
- Sun R.Q., Cai R.J., Chen Y.Q., Liang P.S., Chen D.K. & Song C.X. (2012). Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerg Infect Dis*. 18(1): 161-3.
- Toan N.T., Puranaveja S. & Thanawongnuwech R. (2011). Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates from southern Vietnam during 2009-2010 outbreaks, *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 41(1): 55-64.
- Thomas J.T., Chen Q., Gauger P.C., Gimenez-Lirola L.G., Sinha A., Harmon K.M., Madson D.M., Burrough E.R., Magstadt D.R., Salzbrenner H.M., Welch M.W., Yoon K.J., Zimmerman J.J. & Zhang J. (2015). Effect of porcine epidemic diarrhea virus infectious doses on infection outcomes in naive conventional neonatal and weaned pigs. *PLoS One*. 10(10): e0139266.
- Wang L., Byrum B. & Zhang Y. (2014). New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States. *Emerg Infect Dis*. 20(5): 917-9.
- Zhao P.D., Bai J., Jiang P., Tang T.S., Li Y., Tan C. & Shi X. (2014). Development of a multiplex TaqMan probe-based real-time PCR for discrimination of variant and classical porcine epidemic diarrhea virus. *J. Virol Methods*. 206: 150-5.