

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN : CÔNG NGHỆ SINH HỌC



Tiểu luận:

Chuẩn đoán virus PRRS (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus) bằng kỹ thuật gen

Giảng viên

Sinh viên thực hiện

PGS. TS. Nguyễn Ngọc Hải

Đỗ Phong Lưu

06126076

Tp.HCM. tháng 10/2009

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngành chăn nuôi nói chung hay chăn nuôi heo nói riêng có một vị trí quan trọng trong ngành nông nghiệp vì nó là nguồn cung cấp thực phẩm cho nhân dân và phân bón cho sản xuất cây trồng. Không chỉ vậy hàng năm chăn nuôi heo còn đem về một nguồn thu nhập ngoại tệ đáng kể cho nền kinh tế quốc dân.

Trong quá trình chăn nuôi, vấn đề dịch bệnh được xem là trở ngại lớn nhất đối với việc phát triển của đàn heo. Một trong các loại dịch bệnh thường được nhắc đến nhiều nhất thời gian gần đây là dịch “heo tai xanh”, hay còn gọi là “ Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp” ở lợn (PRRS) đã làm nghề chăn nuôi lợn điêu đứng. Đây là bệnh truyền nhiễm cấp tính do virus ở lợn với hội chứng vừa gây ra rối loạn sinh sản ở lợn cái: sảy thai, chết thai, sinh chết yếu, vừa gây ra hội chứng viêm đường hô hấp ở lợn con theo mẹ, lợn sau cai sữa. Bệnh được phát hiện lần đầu tiên ở Mỹ (1987) và nghiên cứu tìm ra virus gây bệnh ở Hà Lan (Viện Thú y Lelystad, 1990). Bệnh đã gây ra thiệt hại kinh tế rất lớn cho nghề chăn nuôi lợn ở hầu hết các nước trên thế giới. Đầu năm 2007, dịch bệnh tai xanh đã bùng phát, lây lan nhanh trên phạm vi 13 tỉnh và khắp 3 miền: Bắc – Trung – Nam, trong đó dịch nặng nhất ở vùng Đồng bằng sông Hồng với 8 tỉnh có dịch. Tổng số lợn ốm khoảng gần 70.000 con, trong đó 15.000 bị chết và phải xử lí. Nguyên nhân làm cho lợn mắc bệnh và chết nhiều là do virus PRRS có nhiễm khuẩn kế phát của một số vi khuẩn gây bệnh đường hô hấp, nguy hiểm nhất là có nhiều bệnh lây nhiễm sang người và gây tử vong cho người.

Đứng trước thực trạng đó, việc chọn ra 1 phương pháp hữu hiệu để chuẩn đoán virus PRRS là hết sức cấp bách và cần thiết, nhằm kiểm tra nhanh chóng và chính xác sức khỏe đàn lợn qua đó đảm bảo an toàn cho người sử dụng. Với vấn đề này, em đã tập trung tìm hiểu về phương pháp chuẩn đoán virus PRRS bằng kỹ thuật gen. Có thể trong bài tiểu luận này vẫn còn nhiều vấn đề em chưa trình bày thoả đáng, kính mong thầy cùng các bạn góp ý để bài được hoàn thiện hơn.

I. TÌNH HÌNH DỊCH BỆNH PRRS

I.1. Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (PRRS) là bệnh xảy ra trên lợn với đặc điểm gây sảy thai ở lợn nái và rối loạn đường hô hấp trên lợn sơ sinh và lợn choai (Christianson và ctv, 1992). Bệnh được phát hiện lần đầu tiên ở Bắc Mỹ vào khoảng năm 1987, sau này được tìm thấy ở Châu Âu (Albina, 1997), Pháp, Tây Ban Nha, Canada và ở Châu Á vào đầu những năm 1990 (Murakami và ctv, 1994; Shimizu và ctv, 1994). Cho đến nay, PRRS đã lan rộng trên các vùng khắp thế giới với những đặc trưng của từng chủng khác nhau trên từng vùng, gây ra những thiệt hại kinh tế nặng nề hàng năm (Albina, 1997; Blaha, 2000; Gao, 2004). Ở Việt Nam, bệnh được phát hiện vào năm 1997 trên đàn lợn nhập từ Mỹ (10/51 con có huyết thanh dương tính). Các nghiên cứu về bệnh trên những trại lợn giống tại các tỉnh phía Nam cho thấy tỷ lệ lợn có huyết thanh dương tính với bệnh rất khác nhau, từ 1,3% cho tới 68,29%. Ở các nước khác, tỷ lệ đàn trong vùng bệnh có huyết thanh dương tính rất cao, như ở Anh là 60-75%, Mỹ là 36% (Phòng Dịch Tễ – Cục Thú y, 2007)

II.2. Virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV)

PRRS do *Arterivirus* gây nên – loại virus này được phân lập và định loại vào năm 1991, được xếp vào loài *Nidovirales*, họ *Arteriviridae*, giống *Arterivirus*, gần với *equine arteritis virus* (EAV), *Lactic Dehydrogenase virus* (LDHV) và *simian hemorrhagic fever virus* (SHFV) (Dea và ctv, 2000), có kích thước vào khoảng 50-70nm, chịu được nhiệt độ thấp (tồn tại 4 tháng dưới nhiệt độ -70°C).

II.3. Các chủng virus PRRS và sự phân bố của chúng

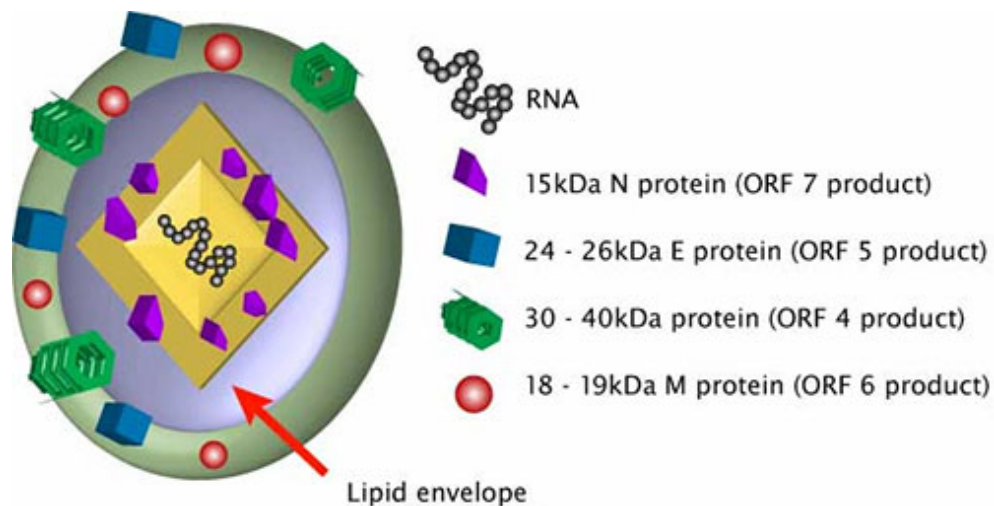
Hiện có các dòng gây bệnh tại Mỹ và Châu Âu. Các nghiên cứu phân tử cho thấy giữa virus gây PRRS tại Châu Âu và Mỹ chỉ tương đồng 60% về nguyên liệu di truyền (bộ gene virus). Tùy theo ORF mà sự tương đồng về gene giữa 2 dòng PRRSV châu Mỹ và châu Âu dao động từ 52-81%

I.4. Cấu trúc phân tử của virus PRRS

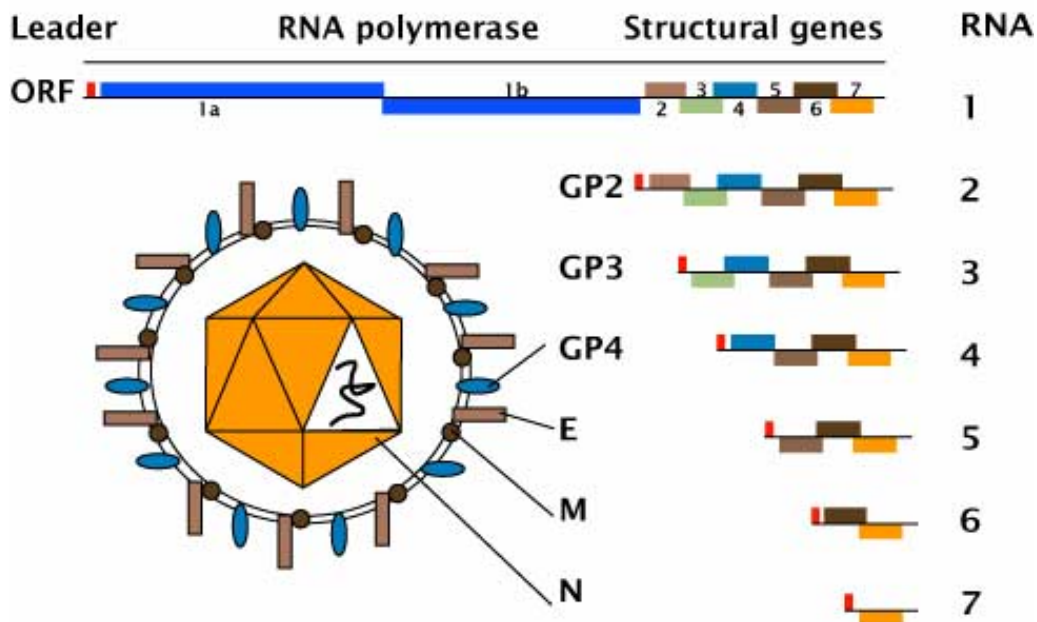
I.4.1. Cấu trúc virion

PRRSV là virus có vỏ bao, đường kính khoảng 50-70 nm. Virus dài khoảng 15kb và gồm 8 khung đọc mở ORF. Cho đến nay, người ta đã xác định các cấu trúc chính của PRRSV là :

- Gene mã hóa protein vỏ glycoprotein (ORF 5, khoảng 24-25 kDa)
- Gene mã hóa protein nhân nucleocapsid (ORF7, khoảng 15 kDa)
- Gene mã hóa protein màng (ORF6, khoảng 19 kDa).

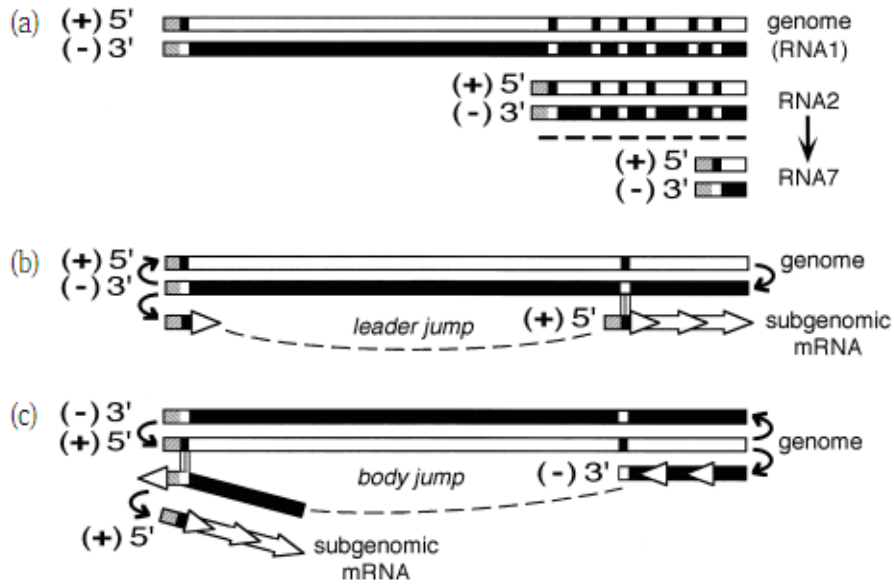


Genome PRRSV



4.2. Tổ chức bộ gen của virus PRRS

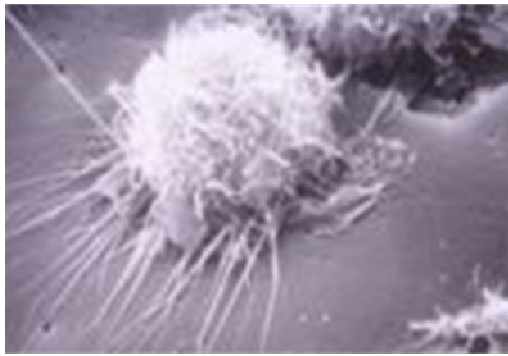
Chuỗi hệ gen đầy đủ của virus PRRS được xác lập vào năm 1993, nó có kích thước khoảng 15,1 đến 15,5 kb và chứa 8 khung đọc mở nằm bên sườn hai vùng không dịch mã (untranslated region - UTR) 5'UTR và 3'UTR, và có cấu trúc mũ methyl tại đầu 5' và đuôi poly (A) tại đuôi 3' (hình 2.2). Ngoài ra, một khung đọc mở bên trong (internal ORF) được tìm thấy trên ORF2 của virus PRRS (Snijder và ctv, 1999). ORF 1a và 1b định vị xuôi dòng từ đầu 5'-UTR, nó chiếm giữ khoảng 75% của bộ gene và ghi mã protein không cấu trúc, liên quan đến sự nhân bản của virus (Meulenberg và ctv., 1997; Dinten và ctv., 1999). ORF1a được dịch mã trực tiếp trong khi ORF1b được dịch bởi khung dịch chuyên ribosomal. Chuỗi protein ORF1ab liên quan đến sự sao chép virus và bộ phận bản sao (Allende và ctv, 1999). ORF 2-7 định vị ngược dòng từ 3'-UTR, mã hóa một loạt các protein cấu trúc của virus như: protein vỏ ngoài (E) và protein vỏ nhân capsid (N) (Nucleocapsid protein) (Nelson và ctv, 1995). Các protein này đều được dịch mã từ một 3' UTR được định vị cố định trên các đoạn subgenomic mRNAs (sg mRNAs) (Eric và Janneke, 1998). Các sg mRNAs được sản xuất thông qua sự sao mã mRNA không liên tục. Trình tự “leader” chung thu được từ đầu 5' của genomic mRNA được gắn với trình tự thân 3' (3' terminal body sequence), đây là trình tự không liên tục trong bộ gen (Meulenberg và ctv., 1993). Sự liên kết giữa “leader” và vùng thân của sg mRNA được hình thành nhờ “trình tự điều hoà dịch mã” liên ứng (consensus “transcriptional regulatory sequence” - TRS) đây là yếu tố điều khiển quan trọng cho biểu hiện gen cấu trúc. Sg mRNA chia sẻ đuôi 3' của nó, nhưng chỉ ORF đầu tiên tại đầu 5' của mỗi bản sao được dịch mã bằng việc dùng TRS như một promoter (Yuan và ctv., 2004).



Hình 1.3 Tổ chức bộ gen và mô hình nhân bản của virus PRRS (Nguồn: Snijder, 1998). (a) Bộ cấu trúc lồng vào nhau của RNA arterivirus; (b) sự sao mã không liên tục xảy ra trong quá trình tổng hợp RNA sợi (+); (c) mô hình khác kết hợp chặt chẽ với sự tổng hợp RNA sợi (-) không liên tục. (+) sợi dương; (-) sợi âm.

I.5. Cơ chế gây bệnh

Virus PRRS có thể xâm nhập và nhân lên trong các đại thực bào (các tế bào có tác dụng bắt và tiêu diệt các tác nhân gây bệnh). Khi hình thành các virion, virus phá hủy các đại thực bào làm suy yếu sức đề kháng của cơ thể.



Đại thực bào với các "chân giã"

Đại thực bào không còn "chân giã"

I.6. Phân bố của bệnh

Tuy được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1987 tại Mỹ nhưng một số nghiên cứu dịch tễ học cho rằng có thể bệnh đã lưu hành trước đó tại Canada. Bệnh xuất hiện ở Châu Âu vào năm 1990 và hiện đã lưu hành ở nhiều nước thuộc châu lục này. Các kiểm tra huyết thanh học và virus học cho thấy PRRS cũng đã có mặt tại Nhật Bản, Hàn Quốc, Philippines, Nam Mỹ, các nước vùng Ca-ri-bê... Trong những ngày gần đây, bệnh đã xuất hiện tại nhiều địa phương ở nước ta. Cũng như các virus khác, virus gây PRRS cũng tạo điều kiện cho nhiều loại vi khuẩn cư trú trong cơ thể như liên cầu khuẩn tăng độc lực và gây bệnh.

I.7. Triệu chứng lâm sàng

Căn cứ vào sự biểu hiện các triệu chứng của bệnh, người ta có thể chia thành hai giai đoạn khác nhau: giai đoạn 1 là biểu hiện các triệu chứng rối loạn sinh sản đối với lợn nái và giai đoạn hai là sự biểu hiện của các triệu chứng hô hấp. Trong khoảng 6-12 tuần sẽ có biểu hiện bệnh trong đàn lợn.

Các triệu chứng trong giai đoạn 1 hay các triệu chứng sinh sản bao gồm:

- Sốt 39-40 độ
- Bỏ ăn
- Mệt mỏi
- Giảm tỷ lệ thụ thai và số con đẻ ra
- Sảy thai (tỷ lệ này có thể đến 50% trong các đàn mới bị nhiễm virus)
- Giảm tiết sữa hoặc mất sữa hoàn toàn
- Thai khô (thai gổ), chết thai
- Đẻ non
- Chậm động dục hoặc không động dục trở lại
- Rối loạn sinh sản có thể kéo dài đến vài tháng

Giai đoạn biểu hiện các triệu chứng hô hấp:

- Loạn hô hấp
- Lợn biểu hiện đau khi thở

Các triệu chứng ở lợn con:

- Tỷ lệ chết trước cai sữa cao
- Lợn gày yếu
- Bỏ ăn

Các triệu chứng thuộc giai đoạn 2 ở lợn con:

- "Hắt hơi"
- Tăng tần số hô hấp, thở khó, thở đứt quãng
- Gày, yếu
- Phù mắt, các nốt phỏng rộp trên da
- Ìa chảy, đi không vững và run, đứng choãi chân.

Lợn lớn có các biểu hiện sốt nhẹ, bỏ ăn. Các triệu chứng khác nhẹ hơn.

Lợn đực giống có các biểu hiện giảm hưng phấn, giảm thể tích và chất lượng tinh dịch (hình thái, hoạt lực và nồng độ tinh trùng).

I.8. Bệnh tích

- Đối với lợn nái, ngoài các triệu chứng sảy thai, tăng tỷ lệ thai chết, lợn mắc bệnh thường không có các bệnh tích đặc thù.

- Lợn con thường mang bệnh tích rõ hơn lợn lớn, bao gồm:

- + Dịch thấm xuất trong đường tiêu hóa và đường hô hấp (đặc biệt trong các phế quản).
- + Phù

+ Thanh dịch trong xoang phúc mạc, xoang ngực, xoang phế mạc và tung cách mạc

+ Sung hạch bạch huyết

+ Da nhiều vùng có màu xanh tím

Lưu ý :

a/ Các bệnh sau cũng có thể gây triệu chứng rối loạn sinh sản

- Bệnh Aujesszky

- Bệnh do xoắn khuẩn (*Leptospirosis*)

- Bệnh lở mồm long móng

- Bệnh sốt lợn cổ điển

- Viêm dạ dày ruột truyền nhiễm (do virus)

- Parvovirus

- Viêm não Nhật Bản

b/ Các bệnh gây các triệu chứng hô hấp dễ nhầm lẫn:

- Bệnh cúm lợn

- Viêm phế quản, phổi

- Viêm phổi do cúm không điển hình

I.9. Đường truyền lây

- Tiếp xúc giữa lợn ốm và lợn khỏe là đường truyền lây chính của bệnh nên bệnh có thể lây giữa các cá thể trong một đàn hay từ đàn này sang đàn khác (nếu lợn bị bệnh được chuyển đàn, chuyển trại...). Lợn mang virus có thể giải phóng virus trong thời gian 3-4 tháng gây khó khăn cho công tác theo dõi và phát hiện và khống chế bệnh.

- Tinh dịch lợn có khả năng nhiễm virus vì vậy bệnh có thể truyền qua đường sinh dục.

- Các chất bài tiết như phân, nước tiểu lợn bệnh cũng có khả năng có virus
- Virus cũng có thể từ lợn bệnh truyền sang lợn khỏe qua các dụng cụ chăn nuôi.
- Virus có mặt trong hạch lâm ba, phổi với số lượng lớn hơn nhiều trong thịt và có khả năng giữ được độc lực trong điều kiện lạnh (khi giữ thức ăn). Tuy vậy, khả năng truyền bệnh do cho ăn các phụ phẩm trong quá trình giết mổ các gia súc bệnh chưa được xác định. Tuy nhiên, tốt hơn hết nên cách ly toàn bộ đàn lợn có nguy cơ với mọi loại nguồn bệnh và không cho ăn các nội tạng từ lợn nghi mắc bệnh.

II. Ứng dụng kỹ thuật gen vào chuẩn đoán virus PRRS

Có rất nhiều phương pháp để chuẩn đoán PRRS trong phòng thí nghiệm. Cụ thể như là :

- Chuẩn đoán PRRSV trên môi trường nuôi cấy tế bào.
- Phương pháp kháng thể huỳnh quang (Fluorescent Antibody Staining - FA) và hoá mô miễn dịch (immunohistochemistry staining - IHC).
- Kỹ thuật miễn dịch peroxidase một lớp (Immunoperoxidase Monolayer Assay)
- Kỹ thuật huỳnh quang gián tiếp (Indirect Immunofluorescence assay – IFA)
- Kỹ thuật RT-PCR chuẩn đoán PRRSV

Trong bài tiểu luận này em xin trình bày phương pháp chuẩn đoán virus PRRS sử dụng kỹ thuật RT-PCR.

RT-PCR là một phương pháp hữu dụng cho việc phát hiện PRRSV (Van Woensel et al., 1994; Suarez et al., 1994). Bằng cách thiết lập các cặp mồi chuyên biệt, RT-PCR có thể phân biệt giữa dòng virus châu Mỹ và dòng virus châu Âu (Mardassi et al., 1994). Phương pháp này được đánh giá nhạy hơn so với phương pháp ly trích virus từ các tế bào PAM, có thể dẫn đến kết quả dương tính giả. Tuy vậy, RT-PCR vẫn là một công cụ hiệu quả trong việc xét nghiệm PRRSV từ các mẫu tinh dịch và các mẫu mà hoạt động lây nhiễm của virus đã bị suy yếu.

II.1. Chuẩn bị mẫu

PRRSV có thể được ly trích từ nhiều mô cơ thể khác nhau, nhưng thông thường, người ta thường sử dụng huyết thanh, tế bào ở lách và phổi. Các tế bào này sẽ được tiến hành ly trích từ 4-6 tuần sau khi PRRSV xâm nhiễm trên heo (Ohlinger et al., 1992; Butner et al., 1994). Sự xuất hiện kháng thể chuyên biệt đối với PRRSV là bằng chứng khẳng định sự có mặt của PRRSV trong đại thực bào *in vitro* (Choi et al., 1992) hay trong cơ thể khi tiêm chủng (Christianson et al., 1993). Khi sử dụng đại thực bào túi phổi ở heo (PAM), không nên lấy mẫu từ heo con đã bú mẹ, bởi vì các kháng thể nhận từ sữa heo mẹ sẽ làm tăng tính nhạy cảm của PAM đối với PRRSV. Thông thường, người ta thường lấy mẫu trên heo từ 4-7 ngày tuổi cho những xét nghiệm trên heo con. Ngoài ra, người ta còn lấy mẫu từ huyết thanh của heo trưởng thành và nái đẻ. Sử dụng những mẫu PAM này sẽ cho kết quả chính xác nhất trong việc xét nghiệm PRRSV trên heo

Sự lựa chọn mẫu cũng phụ thuộc vào giai đoạn nhiễm bệnh (cấp tính, hồi phục hay mãn tính). Trong trường hợp bệnh ở thể cấp tính, nên lựa chọn các loại mẫu huyết thanh, phổi và dịch phế nang để phân lập virus. Nhưng nếu bệnh ở thể mãn tính thì nên dùng các loại mẫu hạch bạch huyết, hạch hạnh nhân, dịch thanh khí quản và dịch phế nang.

Các mẫu bệnh phẩm cần phải được bảo quản ở nhiệt độ 4⁰C hay thấp hơn trong quá trình vận chuyển mẫu đến phòng thí nghiệm và thời gian giữ mẫu ở nhiệt độ này tốt nhất không quá 48 giờ. Những mẫu bệnh phẩm lưu giữ trong một thời gian dài bắt buộc phải được bảo quản ở nhiệt độ -70⁰C, nhưng không bao giờ giữ mẫu ở -20⁰C, không được đông và rã đông mẫu nhiều lần.

II.2. Ly trích RNA từ huyết thanh

Quy trình ly trích RNA theo bộ kit QIAamp Viral RNA Mini Kit

Ổn định mẫu ở điều kiện nhiệt độ phòng (15 – 25⁰C)

Ổn định buffer ở nhiệt độ phòng.

Kiểm tra buffer AW1 và AW2 đã pha và để ổn định ở nhiệt độ phòng.

Hoà tan lại khối kết tủa Buffer AVL/Carrier RNA bằng nhiệt nếu cần thiết và giữ ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

Tất cả các bước ly tâm đều thực hiện ở nhiệt độ phòng.

Bước 1: Cho 560 μ l Buffer AVL có chứa Carrier RNA vào một tube 1.5 ml.

Bước 2: Cho 140 μ l mẫu vào tube có chứa buffer ở trên. Vortex nhẹ để trộn đều trong 15 giây. Nếu mẫu cần phải rã đông thì chỉ nên rã đông một lần.

Bước 3: Ủ ở nhiệt độ phòng (15-25⁰C) trong vòng 10 phút (thời gian hơi kéo dài hơn một chút).

Bước 4: Ly tâm nhẹ.

Bước 5: Thêm 560 μ l ethanol (96-100%), vortex nhẹ trong 15 giây, sau đó ly tâm nhẹ để mẫu dính bên trên rơi xuống.

Bước 6: Hút 630 μ l dịch ở trên cho vào QIAamp spin column (trong một tube 2ml). Chú ý không làm dính vành, đóng nắp, ly tâm với tốc độ 6000 x g (8000 vòng) trong 1 phút. Cho QIAamp spin column vào một tube 2 ml sạch và loại bỏ tube có chứa dịch lọc. (có thể ly tâm với tốc độ cao hơn).

Bước 7: Mở QIAamp spin column và lặp lại bước 6.

Bước 8: Mở nắp QIAamp spin column một cách cẩn thận và thêm 500 μ l Buffer AW1, đóng nắp lại và tiến hành ly tâm với tốc độ 6000 x g (8000 vòng) trong 1 phút. Lấy QIAamp spin column và cho vào một tube 2 ml mới. Bỏ tube có chứa dịch đi.

Bước 9: Mở nắp QIAamp spin column một cách cẩn thận, thêm 500 μ l buffer AW2, đóng nắp lại và ly tâm với tốc độ 20000 x g (14000 vòng) trong 3 phút. Có thể thực hiện ngay bước 10 hay thực hiện bước 9a.

Bước 9a: Chuyển QIAamp spin column vào một tube 2 ml mới, loại bỏ tube cũ có chứa dịch lọc. Ly tâm với tốc độ 14000 vòng trong một phút.

Bước 10: Chuyển QIAamp spin column vào một tube ly tâm 1,5 ml mới. Loại bỏ tube cũ có chứa dịch lọc. Cẩn thận mở nắp QIAamp spin column và thêm 60 μ l AVE. Đóng nắp lại, giữ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút. Sau đó ly tâm với tốc độ 6000 x g (8000 vòng) trong 1 phút.

II.3. Thực hiện phản ứng RT-PCR

RT-PCR được thực hiện với nhiều cặp mồi khác nhau, cho phép phát hiện gene của các ORF7, ORF6 hay ORF1b của virus. RT-PCR có thể được thực hiện với nhiều loại mẫu khác nhau : máu, huyết thanh, mô, tinh dịch, dịch phết quần, dịch phổi...trên cơ thể thú sống hoặc thú chết. Đây là ưu điểm quan trọng của RT-PCR. Một vài cặp mồi sử dụng trong kỹ thuật RT-PCR :

- Rovira và cộng sự, 2002

5' CCT CGT CAA GTA TCG CCG GTA 3'

5'GAC TGT CAA ATT AGC TTG CAC CC 3'

- Meritxel Donadeu, 1999

5' CCA GCC AGT CAA TAC RCT GTG 3'

5' GCG AAT CAG GCG CAC WGT ATG 3'

- Helmi mardassi và cộng sự, 1994

5' ATG GCC AGC AGT CAA TCA 3'

5' TCG CCC TAA TTG AAT AGG TG 3'

Dưới đây là một thí nghiệm cho thấy khả năng chẩn đoán PRRSV bằng PCR trong mẫu tinh dịch

a/ Vật liệu thí nghiệm và phương pháp

- Mẫu tinh dịch : Nuôi cấy chủng virus PRRS ATCC VR-2402 trên đại thực bào túi phổi. Heo dùng lấy mẫu được tiêm 2ml chủng virus được nuôi cấy ở trên ở nồng độ $10^{6.5}$. Tinh dịch được lấy 2 lần mỗi tuần trong suốt 8 tuần sau khi tiêm.

- Primers : Sử dụng 2 loại primer khác nhau :

+ Primer được thiết kế từ ORF 7 của chủng virus VR-2332. Trong đó

- Primer cho phản ứng outer PCR là :

5'-TCGTGTTGGGTGGCAGAAAAGC- 3' (nucleotides 2763-2785)

5'-GCCATTCACCACACATTCTTCC- 3' (nucleotides 3247-3225)

-Primer cho phản ứng nested PCR là :

5'-CCAGATGCTGGGTAAGATCATC-3' (nucleotides 2885-2907)

5'-CAGTGTAACCTATCCTCCCTGA-3' (nucleotides 3121-3099)

+ Primer được thiết kế từ ORF 1b của chủng virus Lelystad (LV). Trong đó :

-Primer cho phản ứng outer PCR là :

5'-CCGTCACCAGTGTGTCCAA-3' (nucleotides 8751-8771)

5'-CCGTTCTGAAACCCAGCAT-3' (nucleotides 9003-8984)

-Primer cho phản ứng nested PCR là :

5'-ACATGGTATTGTCGGCCTT-3' (nucleotides 8803-8822)

5'-CGTTCTGAAACCCAGCATC-3' (nucleotides 9002-8983)

- RNA của PRRSV được phiên mã ngược bằng bộ kit GeneAmp RNA PCR (Applied Biosystems, Foster City, Cali). Phản ứng được thực hiện trong các ống tube không có dầu (oil-free). Phản ứng được thực hiện như sau : 2 microliters dịch RNA được hòa vào một hỗn hợp có nồng độ cuối bao gồm : 5mM MgCl₂, 1X buffer II (10X dung dịch đệm PCR bao gồm 500mM KCl và 100mM Tris-HCl), 1mM mỗi loại dNTP, 1 U enzyme Rnase cho mỗi µl, 2.5 U enzyme reverse transcriptase mỗi µl, 0.75 µM mỗi ngược và 1 µl nước cất cho 20 µl dung dịch. Tất cả hỗn hợp được giữ trong đá lạnh và được chạy trong máy luân nhiệt 1 chu kỳ gồm 42⁰C trong 15 phút, 99⁰C trong 5 phút và 5⁰C trong 5 phút

- Quá trình PCR được thực hiện qua 2 giai đoạn outer và nested.

Giai đoạn 1 : cho 80 µl hỗn hợp thực hiện phản ứng PCR với nồng độ : 2mM MgCl₂, 1X PCR buffer II, 0.15 µM primer outer, 2.5 U enzyme DNA Taq polymerase cho mỗi 100 µl, 65.5 µl nước cất vào sản phẩm của quá trình phiên mã ngược. Hỗn hợp này (100 µl)

được tiến hành phản ứng trên máy luân nhiệt trong 40 chu kỳ, bao gồm : 95⁰C trong 25 giây, 58⁰C trong 5 giây và 74⁰C trong 25 giây

Giai đoạn 2 : cho 2 µl của sản phẩm outer PCR vào một tube mới có nồng độ 3mM MgCl₂, 0.4mM mỗi loại dNTP, 2.5 U enzyme DNA Taq polymerase cho mỗi 50 µl, 2.4 µM cho các primer nested, 8 µl dung dịch đệm PCR II 10X, 19.5 µl nước cất (tube chứa tổng cộng 50 µl). Quá trình được thực hiện trong 30 chu kỳ với thời gian và nhiệt độ như trên

Sau khi kết thúc quá trình phóng đại, 9 µl sản phẩm đem hòa với 2 µl dung dịch đệm 1X. Hỗn hợp này được tiến hành điện di trên gel SeaKem agarose 1% (FMC Bioproducts, Rockland, Maine) chứa 1 µg ethidium bromide cho mỗi 2ml agarose. Sử dụng thang đo là DNA 100bp. Các đoạn 484bp outer ORF 7, 252bp outer ORF 1b, 236bp nested ORF 7, 200bp nested ORF 1b được quan sát thấy dưới đèn chiếu UV.

b/ Kết quả :

- Quan sát điều kiện khuếch đại tối ưu cho phản ứng PCR

Để gia tăng mức độ đặc hiệu và độ nhạy của phản ứng PCR, nồng độ MgCl₂ được thử nghiệm từ 1.6-5 mM ; nồng độ primer dao động từ 0.2-0.4 µM ; nhiệt độ biến tính được thay đổi ở 94, 95 và 98⁰C ; nhiệt độ để primer bắt cặp với khuôn từ 50-58⁰C và số chu kỳ được thực hiện lần lượt là 30, 40 và 45 chu kỳ.

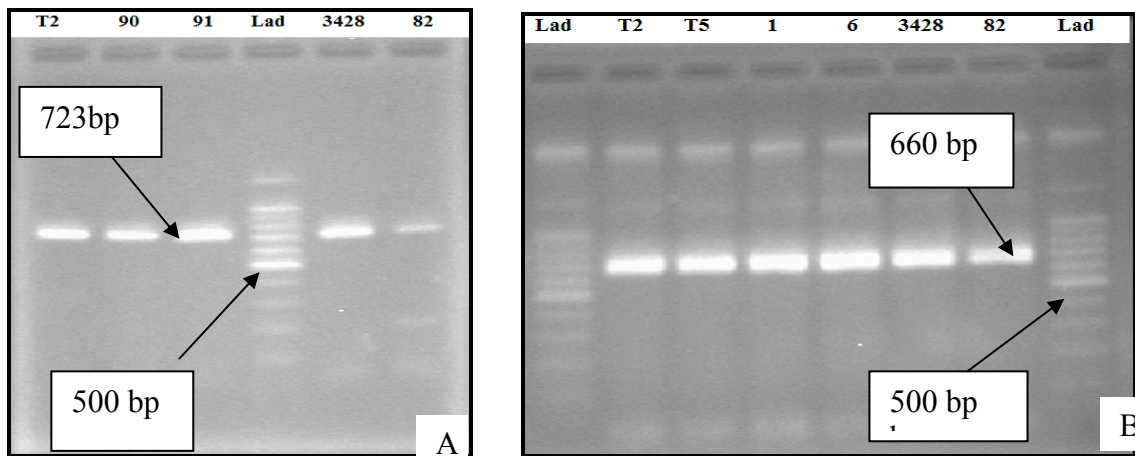
Kết quả thí nghiệm cho thấy với 5mM MgCl₂, 0.4 µM primer, nhiệt độ bắt cặp và biến tính lần lượt là 58 và 95⁰C, thực hiện trong 30 chu kỳ cho kết quả cao nhất

II.4. Điện di sản phẩm PCR

Cách tiến hành:

- Pha dung dịch TBE 0,5X.

- Pha gel agarose với nồng độ 1% : cân 0,15 g agarose cho vào 15 ml dung dịch TBE 0,5X. Đun sôi bằng lò vi ba ở 550W trong 3 phút để agarose tan đều.
- Để nguội đến 50-55⁰C. Chuẩn bị khuôn. Đổ agarose vào khuôn. Chờ 30 phút để agarose đông.
- Gỡ lược ra, để miếng gel vào bồn điện di. Cho TBE 0,5X ngập miếng gel.
- Đặt mẫu vào các giếng với tỉ lệ 1,5 µl loading dye và 4 µl sản phẩm PCR.
- Điện di 75 V, 30 phút.
- Nhuộm ethidium bromide trong 15 phút. Sau đó rửa gel nhiều lần bằng nước để loại bỏ bớt ethidium bromide dính bên ngoài miếng gel. Chụp gel bằng tia UV.
- Đọc kết quả điện di: kích thước vùng gene ORF5 723bp; ORF7 670 bp



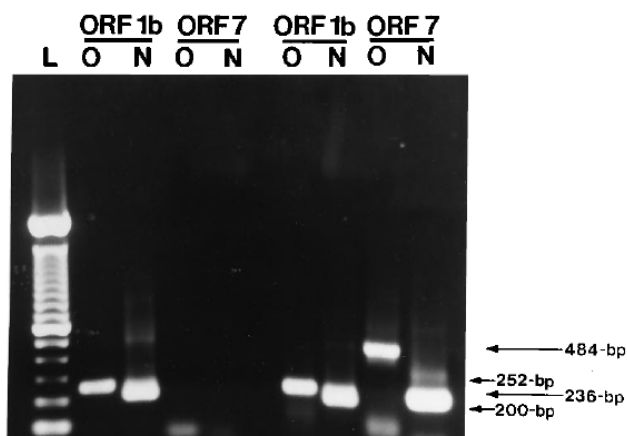
Hình 3.1 Sản phẩm sau điện di của phản ứng RT-PCR. (A) Sản phẩm sau điện di của phản ứng RT-PCR đoạn ORF5 (723 nt); (B) Sản phẩm sau điện di của phản ứng RT-PCR đoạn ORF5 (660 nt).

- Độ đặc hiệu và độ nhạy của phản ứng PCR

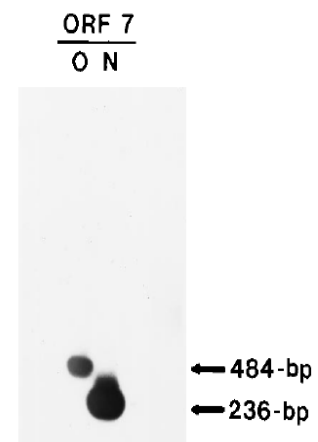
Các giống *Arteriviruses* khác (virus *Arteritis* của ngựa và virus *Lactate dehydrogenase*) không phản ứng với cả hai primer được thiết kế từ đoạn ORF1b và ORF7 của genome PRRSV. Primer được thiết kế từ đoạn ORF7 không phản

ứng với sáu loại virus khác gây bệnh trên heo (transmissible virus, gastroenteritis virus, porcine respiratory coronavirus, rotavirus, pseudorabies virus, parvovirus và swine influenza virus)

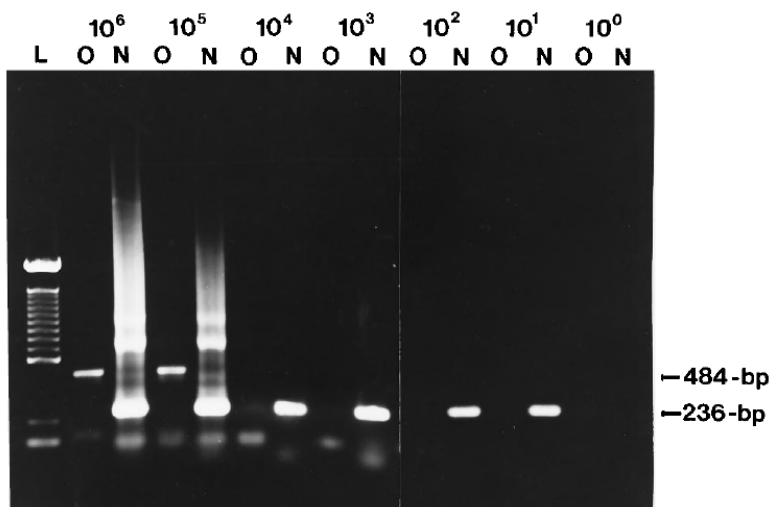
Bảy chủng PRRSV được phân lập và thu nhận từ phòng nghiên cứu và chẩn đoán bệnh của thú thuộc trường đại học Nam Dakota đều được kiểm tra với cả môi ORF1b và ORF7. Tất cả các mẫu đều cho phản ứng với hai loại cặp môi này. Nhóm nghiên cứu cũng đã cho chạy phản ứng PCR, dùng hai loại primer trên với chủng PRRSV LV của châu Âu. Kết quả cho thấy LV có thể được phát hiện bởi primer được thiết kế từ gene mã hóa polymerase (ORF1b của LV) nhưng không được phát hiện bởi primer thiết kế từ gene mã hóa nhân nucleocapsid (ORF7 của VR-2332). Chủng VR-2332 dòng châu Mỹ lại có thể được phát hiện bởi cả hai loại primer (Hình 2.1)



Hình 2.1 : Bảng gel agarose 1% được nhuộm bằng Ethidium bromide cho thấy khả năng phát hiện PRRSV chủng LV và chủng VR-2332. Primer được thiết kế từ ORF1b và ORF7 được sử dụng cho phản ứng outer (O) và nested (N) PCR. Ta sử dụng ladder (L)100bp DNA làm thước đo



Hình 2.2 : Lai probe ^{32}P -oligonucleotide đã đánh dấu phóng xạ lên sản phẩm PCR outer (O) (484bp) và nested (N) (236bp) của primer ORF7



Hình 2.3 : Độ nhạy của phản ứng outer (O) và nested (N) PCR được thể hiện qua phản ứng ở các nồng độ khác nhau của mẫu. Kết quả điện di bằng gel agarose 1% nhuộm ethidium bromide. Ladder (L) có độ dài 100bp. Số lượng phân tử virus ở nồng độ 10¹ là 10 virion/ml

III. Kết luận

Trong nền kinh tế thị trường đòi hỏi người sản xuất tạo ra nhiều sản phẩm. Việc nuôi heo thâm canh đã đáp ứng đòi hỏi của thị trường, chính vì thế đã tạo điều kiện thuận lợi cho chủng virus PRRS có cơ hội phát triển và đột biến tạo ra nhiều chủng mới có độc lực cao. Thông qua bài tiểu luận này ta phần nào hiểu rõ hơn về virus PRRS, nắm được cấu tạo và tác hại mà nó mang đến cho quá trình chăn nuôi ...

Vì vậy, việc chọn ra một phương pháp hiệu quả để chuẩn đoán virus PRRS là rất cần thiết. Trong bài tiểu luận này em đã tập trung vào tìm hiểu phương pháp chuẩn đoán virus PRRS sử dụng kỹ thuật RT-PCR đây là một trong những phương thức chuẩn chính xác và nhanh chóng

Tuy nhiên bên cạnh những mặt tích cực của phương pháp ta cần kể đến một số hạn chế như chi phí để tiến hành còn cao do vật liệu và thiết bị sử dụng cho kỹ thuật này đa phần nhập từ nước ngoài. Bên cạnh đó do độ nhạy của phương pháp nay rất cao nên dễ dẫn đến hiện tượng dương tính giả gây ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm vì thế cần chú ý trong quá trình tiến hành và xem xét kỹ quy trình thực hiện để có được kết quả đáng tin cậy nhất

IV. Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thái Sơn ,Vai trò gây bệnh trên người của H.pylori luận án tiến sỹ y khoa , Hà Nội ,2002,13-15.
2. Đỗ Ngọc Liêm ,miễn dịch học cơ sở , nhà xuất bản đại học quốc gia Hà Nội .
3. Nguyễn Ngọc Lanh , Văn Đình Hoa (chủ biên năm 2003) miễn dịch học xuất bản lần II nhà xuất bản y học Hà Nội .
4. Vũ Triệu An , Jean claude Homberg (2001)miễn dịch học in lần II có sửa chữa bổ sung , nhà xuất bản y học Hà Nội .
5. Nguyễn Ngọc Hải (2007), Công nghệ sinh học trong thú y, Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
6. Phan Văn Chinh, bài giảng môn học bệnh truyền nhiễm, Khoa chăn nuôi thú Y, Trường Đại Học Nông Lâm.
7. Hướng dẫn phòng trị bệnh ký sinh trùng,bệnh nội khoa và nhiễm độc ở bò sữa. PGS.TS Phạm Sỹ Lăng – PGS.TS Lê Văn Tạo. NXB Nông Nghiệp Hà Nội,2006.
8. Đỗ Ngọc Liêm ,miễn dịch học cơ sở , nhà xuất bản đại học quốc gia Hà Nội .
9. CHO H.J., MCNAB B., DUBUC C., JORDAN L., AFSHAR A., MAGAR R., PRINS S. & EERNISSE K. (1997). Comparative study of serological methods for the detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Can. J. Vet. Res., 61, 161–166.
10. E. KOSINOVA, I. PSIKAL, Restriction fragment length polymorphism of ORF6 and ORF7 genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine strains registered in the Czech Republic, Veterinarni Medicina, 51, 2006 (8): 414–422
11. S. INDIK, L. VALÍČEK , Differentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus European vaccine strains from Czech field isolates by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF5 gene, Vet. Med. -Czech, 47, 2002 (10–11): 295–301

12. Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (bệnh tai xanh) và bệnh liên cầu khuẩn ở lợn. PGS.TS Phạm Sỹ Lăng, TS Văn Đăng Kỳ, nhà xuất bản Nông Nghiệp.

13. các trang web:

[http://online.tvu.edu.vn/mod/scorm/player.php?a=1220¤torg=eXeTDL
YBAI2470051721c248b61832&scoid=10682](http://online.tvu.edu.vn/mod/scorm/player.php?a=1220¤torg=eXeTDLYBAI2470051721c248b61832&scoid=10682)

www.porcilis-prrs.com

<http://aa.wrs.yahoo.com>

<http://www.asifac.com.vn/sanpham/sanpham.php?Act=sp&Ca=1&xem=2>

.....

MỤC LỤC

Đặt vấn đề.....	4
I. Tình hình dịch bệnh PRRS	5
I.1. Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn.....	5
I.2. Virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV).....	5
I.3. Các chủng virus PRRS và sự phân bố của chúng	5
I.4. Cấu trúc phân tử của virus PRRS.....	6
I.5. Cơ chế gây bệnh.....	8
I.6. Phân bố của bệnh.....	9
I.7. Triệu chứng lâm sàng	9
I.8. Bệnh tích	10
I.9. Đường truyền lây	11
II. Một số phương pháp chẩn đoán trong phòng thí nghiệm	12
II.1. Chuẩn bị mẫu	13
II.2. Ly trích RNA từ huyết thanh.....	13
II.3. Thực hiện phản ứng RT-PCR.....	15
III. Kết luận.....	20
IV. Tài liệu tham khảo	21