

ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH TRUNG HÒA ĐỘC TỐ VT2E CỦA PROTEIN TÁI TỔ HỢP MBP-VT2EB

IMMUNITY RESPONSE NEUTRALIZES VT2E TOXIN OF RECOMBINANT PROTEIN MBP-
VT2EB

Nguyễn Ngọc Hải

Bộ môn Vi sinh - Truyền nhiễm, Khoa Chăn nuôi - Thú y, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh.

E.mail: nnhai@hcmuaf.edu.vn, nguyenngochai62@yahoo.fr

ABSTRACT

Recombinant *Escherichia coli* expressing the fusion protein B-subunit of VT2e was used for producing this protein. The fusion protein B-subunit of VT2e purified was used for an immunizing trial on rabbit. At the level of 50µg - 100µg of fusion protein B-subunit of VT2e, the titer at 1/64 to 1/128 of neutralisant antibody of 3TCID₅₀ was obtained on vero cell culture. The results demonstrated that the fusion protein B-subunit of VT2e in the study could be used for the vaccination trials against oedema disease in pigs.

Keywords: VT2e or SLT-II2e, fusion protein, neuralisant antibody.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh phù do vi khuẩn *E. coli* gây ra trên heo sau cai sữa luôn là vấn đề lo ngại của các nhà sản xuất heo. Bệnh xảy ra đột ngột, thường gây tử vong cao, có thể đến 90 -100% thú có triệu chứng bệnh. Việc phòng bệnh chủ yếu hiện nay vẫn là dùng kháng sinh trộn vào thức ăn, tuy nhiên, liệu pháp này ngày càng giảm tác dụng, tạo thêm nguy cơ đề kháng đối với kháng sinh ở các loài vi khuẩn đường ruột và tồn dư kháng sinh trong thịt.

Việc dùng vắc xin để ngừa bệnh cho heo có lẽ là phương pháp tốt nhất. Nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu các loại vắc xin độc tố vô hoạt nhưng vẫn chưa thu được kết quả mong muốn do sự vô hoạt không hoàn toàn về độc tính của kháng nguyên.

Độc tố verotoxin do vi khuẩn *E. coli* gây phù trên heo là loại độc tố thuộc nhóm Shiga-like toxin. Độc tố VT2e cũng như các loại độc tố Shiga-like toxin được cấu tạo bởi 2 thành phần: 1 tiểu phần A (Active) có tác dụng độc và 5 tiểu phần B (Binding) giúp độc tố gắn lên tế bào mẫn cảm, tạo điều kiện cho tiểu phần A xâm nhập vào trong tế bào, gây độc và làm chết tế bào. Nếu độc tố không gắn lên được trên tế bào thì độc tố sẽ không có tác dụng gây độc trên tế bào, nghĩa là nếu trong cơ thể thú có kháng thể chống lại tiểu phần B thì kháng thể này sẽ kết hợp đặc hiệu với tiểu phần B, ngăn cản sự kết bám của độc tố lên tế bào vật chủ và giúp thú chống lại bệnh do vi khuẩn *E. coli* sản sinh độc tố này gây ra.

Kết quả của thử nghiệm sẽ cho phép hiểu rõ hơn về khả năng sử dụng và phát triển vac-xin tiểu phần B độc tố VT2e trong kiểm soát bệnh phù trên heo sau cai sữa.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nội dung

- Định tính kháng thể trung hòa protein tái tổ hợp MBP-VT2eB bằng phương pháp kết tủa trên thạch (Agar Gel Precipitation)
- Định lượng kháng thể trung hòa độc tố VT2e trên môi trường tế bào vero

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch đối với protein tái tổ hợp MBP-VT2eB

Thí nghiệm được tiến hành trên 3 con thỏ, cách 4 tuần thì tiêm và lấy máu 1 lần, tiêm 5 lần với liều protein tái tổ hợp MBP-VT2eB giảm dần từ 100 µg đến 50 µg trong dung dịch Al(OH)₃, đường tiêm dưới da. Dịch tiêm được pha sẵn và bảo quản ở 4°C. Ngày 0, lấy 1 ml máu (đối chứng), ngày 1: tiêm mũi đầu tiên với liều 100 µg MBP-VT2eB/thỏ, các lần tiêm sau tiêm liều 50 µg MBP-VT2eB/thỏ. Kháng huyết thanh được bảo quản ở -20°C dùng cho xét nghiệm kháng thể trung hòa trên môi trường tế bào vero.

Đánh giá

Định tính: Phản ứng kết tủa khuếch tán kép trên thạch (kỹ thuật Ouchterlony)

1,5 g agarose được làm tan trong 100 ml đệm PBS 1X, đun đến khi agarose tan hoàn toàn. Đồ thạch 6,5 cm x 6 cm, dày 3 mm trên tấm phim trong, tạo các giếng trên thạch. Xét nghiệm được thực hiện với mẫu huyết thanh đối chứng thu trước khi tiêm kháng nguyên, mẫu kháng huyết thanh chưa pha loãng, mẫu protein tái tổ hợp MBP-VT2eB nồng độ 1,588 mg/ml được pha loãng theo tỉ lệ 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, mẫu kháng huyết thanh được pha loãng theo tỉ lệ 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32.

Hút kháng nguyên và kháng thể vào các giếng tương ứng, đặt thạch vào buồng ẩm ở 4°C. Khoảng 24 – 48g sau quan sát đường tủa, ép khô thạch và nhuộm với thuốc nhuộm đỏ Ponceau S 0,2%. Quan sát và đánh giá.

* *Định lượng:* Phản ứng trung hoà độc tố VT2e trên môi trường tế bào vero

* *Xác định liều TCID₅₀* (Tissue Culture Infectious Dose 50)

+ Chuẩn bị độc tố VT2e

Vi khuẩn *E. coli* 0139 K82 (H28) có gen quy định độc tố VT2e được nuôi cấy trong môi trường LB, ở 37°C, lắc 150 vòng/phút trong 24 giờ. Dịch nuôi cấy được ly tâm 10.000 vòng trong 30 phút. Thu dịch trong để thử độc tố trên tế bào vero.

+ Chuẩn bị tế bào vero

Tế bào vero (ATCC ref. CCL-81) được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê (FBS), 2 mM gentamycin trong các chai nuôi cấy 25 cm², ở 37°C, 5%CO₂. Tế bào được chuyển vào vỉ 96 giếng ở nồng độ tế bào là 300.000 tế bào/ml, 100 µl tế bào được cho vào mỗi giếng, ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ.

+ Xác định liều TCID₅₀

Đối chứng (-) 1: giếng chỉ chứa môi trường nuôi cấy tế bào DMEM. Đối chứng (-) 2: giếng chứa dịch lọc canh khuẩn *E. coli* DH5α. Liều TCID₅₀ là nồng độ gây chết 50% tế bào vero trong giếng nuôi cấy tế bào ở thời điểm 48 giờ nuôi cấy dựa theo giá trị OD_{620nm} của tế bào với thuốc nhuộm xanh methylen, so sánh giữa giếng có độc tố và giếng đối chứng (-) 2. Giá trị TCID₅₀ được xác định bằng phương pháp Reed – Muench.

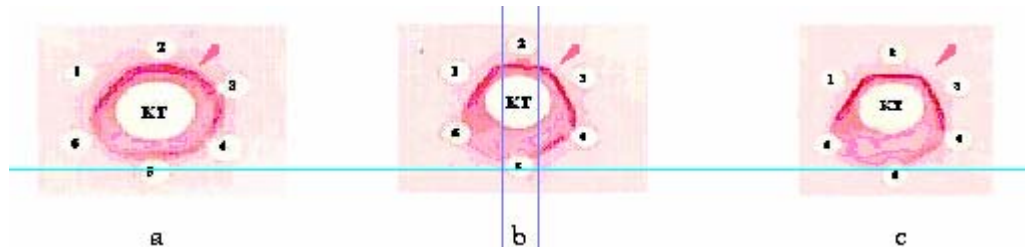
+ Xác định hiệu giá kháng thể trung hòa độc tố VT2e trên môi trường tế bào vero

Kháng huyết thanh pha loãng bậc hai được ủ với liều 3TCID₅₀ độc tố VT2e ở 37°C trong một giờ và ở 4°C qua đêm. Cấy hỗn hợp kháng huyết thanh - độc tố đã ủ vào phiến 96

giếng chứa tế bào vero đã nuôi cấy 24 giờ. Tiếp tục nuôi tế bào vero ở 37°C thêm 2 ngày. Quan sát sự huỷ hoại tế bào do verotoxin không bị trung hoà và đánh giá kết quả. Đối chứng (+) là những giếng chỉ có tế bào vero. Đối chứng (-) là những giếng được ủ với 100 µl dịch lọc vi khuẩn có nồng độ TCID₅₀ đã xác định ở trên. Đối chứng tế bào là những giếng được ủ với 100 µl kháng huyết thanh chưa pha loãng. Xác định hiệu giá kháng thể bằng phương pháp Reed – Muench.

Bảng 1. Kết quả đáp ứng miễn dịch đối với protein tái tổ hợp MBP-VT2eB trên thỏ (phương pháp kết tủa khuếch tán trên thạch)

Thỏ	Đối chứng	Mũi nhắc lại 1	Mũi nhắc lại 2
1	-	-	+
2	-	+	+
3	-	+	+



Hình 1. Kết quả phản ứng kết tủa khuếch tán trong thạch

a, b, c: huyết thanh thỏ 1, 2, 3 tương ứng. Giếng 1, 2, 3, 4, 5, 6 chứa 10 µl protein MBP-VT2eB

pha loãng từ nồng độ ban đầu đến nồng độ 1/32. Giếng giữa chứa 10 µl kháng huyết thanh.

Vạch kết tủa kháng thể kháng protein tái tổ hợp và protein tái tổ hợp (mũi tên chỉ).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định kháng thể đặc hiệu với protein tái tổ hợp MBP-VT2eB bằng kỹ thuật kết tủa trên thạch

Để đánh giá sơ bộ sự hiện diện của kháng thể đặc hiệu kháng protein tái tổ hợp MBP-VT2eB, phản ứng kết tủa trên thạch đã được tiến hành với các mẫu kháng huyết thanh thu được từ thỏ ngay từ lần tiêm nhắc thứ nhất. Kháng thể đặc hiệu kháng protein tái tổ hợp MBP-VT2eB đã hiện diện ở 2/3 thỏ sau mũi tiêm nhắc thứ nhất và ở cả 3/3 thỏ thí nghiệm sau mũi tiêm nhắc thứ hai (bảng 1 và hình 1).

Hiệu giá kháng thể trung hòa

Thử nghiệm trung hòa độc tố VT2e đã được tiến hành trên tế bào vero với liều 3TCID₅₀. Hiệu giá kháng thể trung hòa được tính ở mức pha loãng kháng huyết thanh cao nhất có thể ngăn cản 100% tác động huỷ hoại tế bào vero của độc tố VT2e. Từ những trị số đo OD₆₂₀ xác định được nồng độ kháng huyết thanh trung hòa liều 3 TCID₅₀ sau lần tiêm nhắc thứ tư lần lượt là 1/64, 1/64 và 1/128 ở 3 thỏ khác nhau.

Thảo luận

Vắc xin sử dụng protein tái tổ hợp là một trong những hướng nghiên cứu và phát triển trong chiến lược kiểm soát các bệnh truyền nhiễm. Tuy dựa trên những nguyên tắc sinh học tự nhiên, các loại protein được sản xuất nhờ vào công nghệ di truyền đôi khi vẫn không đảm bảo đầy đủ các tính chất sinh học cần thiết. Đối với các sản phẩm dùng trong

vaccine, việc kiểm tra khả năng gây đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên là một trong những khâu đầu tiên và quan trọng nhất.

Trong phản ứng kết tủa trên thạch, kết quả nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận các vạch kết tủa dương tính hoàn toàn ở tất cả các mẫu kháng huyết thanh được thử. Điều này có nghĩa là protein tái tổ hợp MBP-VT2eB đã có thể gây kích ứng miễn dịch ở thỏ và tạo được kháng thể đặc hiệu đối với protein tái tổ hợp MBP-VT2eB. Tuy nhiên do protein tái tổ hợp được cấu tạo bởi 2 thành phần: protein dung hợp MBP (Maltose Binding Protein) và protein tiểu phần B độc tố VT2e nên không loại trừ khả năng kết quả dương tính thu được trong phản ứng kết tủa trên thạch có thể là do sự kết hợp đặc hiệu của kháng thể kháng MBP và VT2eB. Trong trường hợp này kháng thể được tạo thành sẽ không có khả năng ngăn chặn tác động gây độc của độc tố VT2e trên tế bào và kết quả là sẽ không bảo vệ được thú khỏi tác động của độc tố VT2e hay nói khác đi là không bảo vệ được thú chống lại vi khuẩn *E. coli* gây phù trên heo dù đã được tiêm vaccine protein tái tổ hợp MBP-VT2eB.

Khả năng bảo vệ thú chỉ có thể có được nếu protein tái tổ hợp có khả năng tạo được kháng thể trung hòa độc tố VT2e, vì thế cần tiến hành các thử nghiệm xác định khả năng trung hòa của kháng thể đối với độc tố VT2e. Trong điều kiện *in vitro*, có thể tiến hành thử nghiệm này trên môi trường nuôi cấy tế bào vero. Độc tố VT2e có khả năng gây độc mạnh đối với tế bào vero. Tế bào vero vì vậy được xem như là một môi trường thử nghiệm *in vitro* phù hợp nhất để xác định độc lực của độc tố VT2e. Từ kết quả thu được trong thử nghiệm trung hòa độc tố VT2e trên tế bào vero, chúng tôi ghi nhận kháng huyết thanh thu nhận từ thỏ được gây miễn dịch bằng protein tái tổ hợp MBP-VT2eB có thể trung hòa hoàn toàn tác động gây độc của liều 3TCID₅₀ độc tố VT2e trên tế bào vero ở mức hiệu giá trung bình từ 1/64 đến 1/128. Kết quả này cho thấy protein tái tổ hợp MBP-VT2eB được tạo ra trong nghiên cứu của chúng tôi hoàn toàn có khả năng tạo ra kháng thể đặc hiệu trung hòa được độc tố VT2e, yếu tố gây bệnh phù trên heo của vi khuẩn *E. coli* sản xuất độc tố VT2e. Trong những nghiên cứu của Gordon và cộng sự (1992), hiệu giá kháng thể trung hòa độc tố VT2e là từ 1/128 đến 1/152, tuy nhiên các tác giả trên chỉ thực hiện trung hòa ở liều 2TCID₅₀ độc tố VT2e, thấp hơn liều độc tố sử dụng trong nghiên cứu của chúng tôi (3TCID₅₀). Hơn nữa, kháng nguyên mà các tác giả này sử dụng (độc tố VT2e vô hoạt hoặc độc tố biến dị nhược độc) vẫn còn gây nên các tác dụng phụ trên heo được gây đáp ứng miễn dịch (tăng trọng kém hoặc gây những bệnh tích trên mô...).

Protein tái tổ hợp MBP-VT2eB thể hiện rõ khả năng gây đáp ứng miễn dịch tốt, tạo kháng thể trung hòa độc tố VT2e với mức hiệu giá khá cao. Điều này cho thấy protein tái tổ hợp MBP-VT2eB có thể được sử dụng cho các thử nghiệm phòng bệnh phù do *E. coli* sản sinh độc tố VT2e trên heo.

KẾT LUẬN

- Protein tái tổ hợp MBP-VT2eB có khả năng kích thích miễn dịch tốt trên thỏ, tạo kháng thể trung hòa độc tố VT2e trên tế bào vero ngay sau lần tiêm nhắc đầu tiên.
- Hiệu giá kháng thể trung hòa độc tố VT2e vào khoảng 1/64 đến 1/128 trên tế bào vero với liều 3TCID₅₀.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bosworth B.T., Samuel J.E., Moon H.W., O'Brien A.D., Gordon V.M. and Whipp S.C., 1996. Vaccination with genetically modified shiga-like toxin IIe prevents edema disease in swine. *Infect. Immun.*, **64**: 55-60.
- Franke S., Gunzer F., Wieler L.H., Baljer G. and Karch H., 1995. Construction of recombinant shiga-like toxin-IIv (SLT-IIv) and its use in monitoring the SLT-IIv antibody status of pigs. *Vet. Microbiol.*, **43**: 41-52.
- Gordon V.M., Whipp S.C., Moon H.W., O'Brien A.D. and Samuel J.E., 1992. An enzymatic mutant of shiga-like toxin II variant is a vaccine candidate for edema disease of swine. *Infect. Immun.*, **60**: 485-490.
- Gunzer F., and Karch H., 1993. Expression of A and B subunits of Shiga-like toxin II as fusions with glutathione S-transferase and their potential for use in seroepidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, **31**: 2604-2610.
- Imberechts H., De Greve H., Hernalsteens Schlicker C., Bouchet H., Pohl P., Charlier G., Bertschinger H., Wild P., Vandekerckhove J., Van Damme J., Van Montagu M. and Lintermans P., 1993. The role of adhesive F107 and of SLT-IIv toxin in the pathogenesis of edema disease in pigs. *Zbl. Bakt.*, **278**: 445-450.
- Johansen M., Andresen L.O., Thomsen L.K., Busch M.E., Wachmann H., Jorsal S.E. and Gyles C.L., 2000. Prevention of edema disease in pigs by passive immunization. *Can. J. Vet. Res.*, **64**: 9-14.
- Macleod D.L. and Gyles C.L., 1991. Immunization of pigs with a purified shiga-like toxin II variant toxoid. *Vet. Microbiol.*, **29**: 309-318.
- Makino S.I., Watara I M., Tabuchi H., Shirahata T., Furuoka H., Kobayashi Y. and Takeda Y., 2001. Genetically modified Shiga toxin 2e (Stx2e) producing *Escherichia coli* is a vaccine candidate for porcine edema disease. *Microb. Pathog.*, **31**: 1-8.
- Mukherjee J., Chios K., Fishwild D., Hudson D., O'donnell S., Rich M.S., Donohue-Rolfe A. and Tzipori S., 2002. Human Stx2-specific monoclonal antibodies prevent systemic complications of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect. Immun.*, **70**: 612-619.
- Nguyen Ngoc Hai, 2002. *Maladie de l'œdème du porc au Vietnam: caractérisation des souches d'Escherichia coli responsables, facteurs de pathogénicité et vaccination*. Thèse du doctorat. INPT.
- Sarrazin E. and Bertschinger H.U., 1997. Role of *fimbriae* F18 for actively acquired immunity against porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.*, **54**: 133-44.