

ĐẶC TÍNH SINH MIỄN DỊCH CỦA MỘT SỐ CHỦNG PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM

**Huỳnh Thị Mỹ Lệ*, Tạ Thị Kim Chung, Mai Thị Ngân, Trần Thị Hương Giang,
Vũ Thị Ngọc, Cao Thị Bích Phượng**

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email: huynhtmlmle@yahoo.com*

Ngày nhận bài: 15.01.2016

Ngày chấp nhận: 03.05.2016

TÓM TẮT

Nghiên cứu này thực hiện trên bản động vật nhằm kiểm tra tính kháng nguyên của một số chủng Porcine circovirus type 2 (PCV2) phân lập tại Việt Nam, được lựa chọn làm giống gốc để sản xuất vaccin. Huyết thanh của lợn sau gây miễn dịch được phân tích bằng phản ứng ELISA và phản ứng trung hòa virus. Kết quả cho thấy cả 3 chủng PCV2 thuần khiết đều kích thích lợn thí nghiệm sản sinh đáp ứng miễn dịch dịch thể trong vòng 14 đến 21 ngày và kéo dài tối thiểu tới ngày 56. Huyết thanh của lợn được gây miễn dịch bởi các chủng giống PCV2 đều mang kháng thể có khả năng trung hòa virus.

Từ khóa: Đáp ứng miễn dịch dịch thể, kháng thể trung hòa, porcine circovirus type 2.

Immunogenicity of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Strains Isolated from Pigs in Vietnam

ABSTRACT

This study was conducted to determine the immunogenicity of several porcine circovirus type 2 (PCV2) strains which are chosen as candidates for selection of master seed. The results showed that 3 strains of PCV2 equally invoked the immune response of pigs with measurable level of humoral antibodies within 14 to 21 days and prolonged at least until day 56 post immunization. Sera of pigs immunized by PCV2 strains of different passaging levels all contained neutralizing antibodies against homologous virus.

Keywords: Humoral immune response, neutralizing antibodies, porcine circovirus type 2.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ thập niên 70, ngành chăn nuôi lợn trên thế giới bắt đầu chuyển dịch từ quy chăn nuôi nhỏ sang quy mô chăn nuôi tập trung với số lượng lớn. Ví dụ như ở Mỹ, số đầu lợn nuôi trung bình từ 19 con/đàn (năm 1950) tăng lên quy mô 215 con/đàn (năm 1987) và đạt mức trên 900 con/đàn (năm 2007) (Murtaugh *et al.*, 2010). Gần như đồng thời với sự thay đổi về quy mô và phương thức chăn nuôi, từ những năm 1990, liên tiếp xuất hiện những dịch bệnh truyền nhiễm nguy hiểm ở lợn như hội chứng rối loạn

hô hấp và sinh sản (Wensvoort *et al.*, 1991) và hội chứng bệnh do PCV2 gây ra (Harding, 1996). Trong các dịch bệnh mới nổi đó, hội chứng bệnh do PCV2 gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi lợn trên toàn thế giới (Chae, 2012). Chỉ tính riêng cho ngành chăn nuôi lợn của các nước thuộc liên minh châu Âu, mức thiệt hại kinh tế hàng năm ước tính vào khoảng 562-900 triệu euro (Armstrong and Bishop, 2004).

Ở Việt Nam, bằng chứng huyết thanh học cho thấy sự xuất hiện của PCV2 vào năm 2000. Từ đó đến nay, các nghiên cứu được thực hiện ở

khu vực phía Nam (Nguyễn Thị Thu Hồng và cs., 2006) và khu vực phía Bắc đều khẳng định sự hiện diện và nguy cơ ngày càng lan rộng của PCV2 ở mọi quy mô chăn nuôi lợn (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cs., 2012; Trương Anh Đức và cs., 2015). Đứng trước tình hình dịch bệnh diễn biến rất phức tạp như hiện nay, nhu cầu sử dụng vacxin tạo miễn dịch chủ động đặc hiệu để phòng bệnh do PCV2 gây ra đang được quan tâm. Nhằm đáp ứng đòi hỏi của thực tiễn sản xuất, nhóm nghiên cứu đề tài khoa học cấp Nhà nước mã số KC.04.22/11-15 đã lựa chọn được một số chủng PCV2 thuần khiết, có hiệu giá $\geq 10^{6.00}$ TCID₅₀/ml để làm giống gốc phục vụ nghiên cứu sản xuất vacxin phòng bệnh (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cs., 2015). Nghiên cứu này nhằm làm rõ đặc tính kháng nguyên của chủng virus, một trong những tiêu chí chất lượng quan trọng của giống gốc.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Thực hiện thí nghiệm ở lợn con 21 ngày tuổi, đạt tiêu chuẩn: âm tính PCV2 và âm tính huyết thanh học với kháng thể kháng PCV2. Đối với mỗi chủng giống PCV2 dùng chế kháng nguyên, chọn 2 lần tiếp đời khác nhau để nghiên cứu: chủng phân lập 03 (đời 18, đời 25), 04 (đời 20, đời 26) và 07 (đời 16, đời 20). Lần tiếp đời được lựa chọn dựa vào kết quả nghiên cứu biến động hiệu giá virus giữa các lần tiếp đời, trong đó 3 chủng phân lập có hiệu giá ổn định trong phạm vi: (i) đời 18 ÷ đời 26 (chủng 03), (ii) đời 20 ÷ đời 26 (chủng 04) và (iii) đời 16 ÷ đời 26 (chủng 07). Kháng thể đặc hiệu kháng PCV2 trong mẫu huyết thanh của lợn sau gây miễn dịch được phát hiện bằng kit SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking (Synbiotics). Nguyên liệu dùng xác định sự có mặt của kháng thể trung hòa kháng PCV2 trong mẫu huyết thanh của lợn gồm: tế bào PK15, môi trường DMEM, huyết thanh bào thai bê (FBS) và bộ kit IFA đặc hiệu cho PCV2 (VDPro® PCV2 FA Reagent, Median Diagnostics, Hàn Quốc). Các hóa chất dùng trong phản ứng PCR phát hiện sự bài thải PCV2 ở lợn sau gây miễn dịch gồm: hóa chất tách chiết ADN

tổng số (proteinase K, phenol-chloroform-isoamyl alcohol), bộ kit PCR (i-StarMaster, iNtRON Biotechnology, Hàn Quốc) và cặp mồi đặc hiệu VF2 (5'-GAAGAATGGAAGAAGCGG-3'), VR2 (5'-CTCACAGCAGTAGACAGGT-3') (Yang *et al.*, 2003).

2.2. Địa điểm

Nghiên cứu được tiến hành tại Bộ môn Vi sinh vật - Truyền nhiễm, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam; cùng với sự giúp đỡ của phòng thí nghiệm Nghiên cứu và Phát triển, Công ty Cổ phần Công nghệ phát triển nông thôn (RTD).

2.3. Phương pháp

2.3.1. Gây miễn dịch cho bản động vật

Để chuẩn bị kháng nguyên dùng gây miễn dịch cho lợn, các chủng giống PCV2 có hiệu giá 10^5 TCID₅₀/ml được cô đặc, sau đó bất hoạt bằng Binary ethylenimine ở 37°C trong vòng 24 giờ. Virus sau khi bất hoạt được bổ trợ bằng Rehydragel (10% v/v) và IMS 1313 (10% v/v). Kháng nguyên sau gây nhũ được kiểm tra vô trùng và tiêm cho lợn với liều 1 ml bằng đường tiêm bắp. Tiến hành tiêm nhắc lại sau mũi thứ nhất 14 ngày.

Thí nghiệm gây miễn dịch được thực hiện ở 8 lợn con 21 ngày tuổi. Trong đó 6 cá thể được gây miễn dịch bằng kháng nguyên đã được nhũ hóa kể trên và 2 lợn đối chứng (tiêm chất bổ trợ không có kháng nguyên). Trước khi gây miễn dịch, toàn bộ lợn thí nghiệm được đánh số tai, nuôi thích nghi và theo dõi thân nhiệt trong vòng 7 ngày. Sau gây miễn dịch, tiến hành theo dõi thân nhiệt (đo ở trực tràng) vào thời điểm cố định trong ngày (17h00) và những bất thường khác. Lợn thí nghiệm được lấy máu xét nghiệm tại thời điểm gây miễn dịch (D0), và 7 ngày/ lần (D7, D14, D21, D28, D35, D42, D49, D56,...).

2.3.2. Phát hiện kháng thể kháng PCV2 bằng blocking ELISA

Phản ứng blocking ELISA phát hiện kháng thể đặc hiệu kháng PCV2 trong mẫu huyết thanh được thực hiện theo hướng dẫn của nhà

sản xuất. Phản ứng được đánh giá hợp lệ nếu giá trị OD trung bình của đối chứng âm $>0,800$ và giá trị OD trung bình của đối chứng dương $<0,600$. Các bước tính giá trị S/N (OD giữa mẫu và đối chứng âm) được thực hiện trên bảng tính Excel cung cấp bởi nhà sản xuất. Nếu $S/N \leq 0,4$, mẫu được đánh giá dương tính huyết thanh học; ngược lại nếu $S/N > 0,4$, mẫu được đánh giá âm tính huyết thanh học.

2.3.3. Xác định sự có mặt của kháng thể trung hòa

Phương pháp trung hòa virus được thực hiện theo Meerts *et al.* (2006). Đánh giá kết quả trung hòa được thực hiện gián tiếp bằng phản ứng IFA như sau: đếm số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu, so sánh số lượng tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu giữa mẫu huyết thanh của lợn được gây miễn dịch với đối chứng virus. Nếu có sự giảm về số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu, chứng tỏ có mặt của kháng thể trung hòa trong mẫu huyết thanh xét nghiệm.

2.3.4. Phát hiện PCV2 bằng PCR

Sự bài thải PCV2 (nếu có) của lợn sau khi gây miễn dịch bằng các chủng PCV2 được phát hiện bằng phương pháp PCR (Yang và cs., 2003). Sản phẩm PCR được phân tích bằng phương pháp điện di trong thạch agarose 2%, bổ

sung thuốc nhuộm RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (1x).

2.3.5. Xử lý số liệu

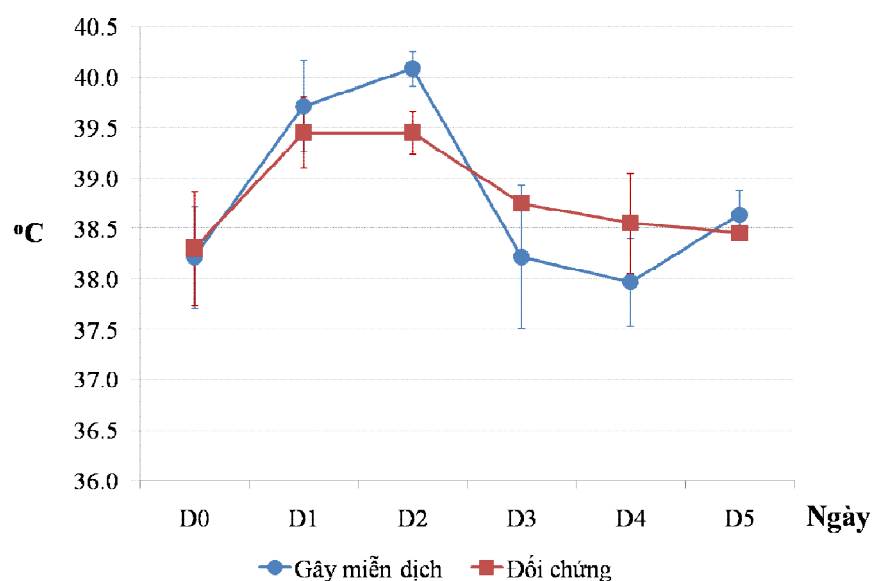
Phân tích sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm bằng phân tích phương sai một nhân tố bằng phần mềm MS Excel 2007.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

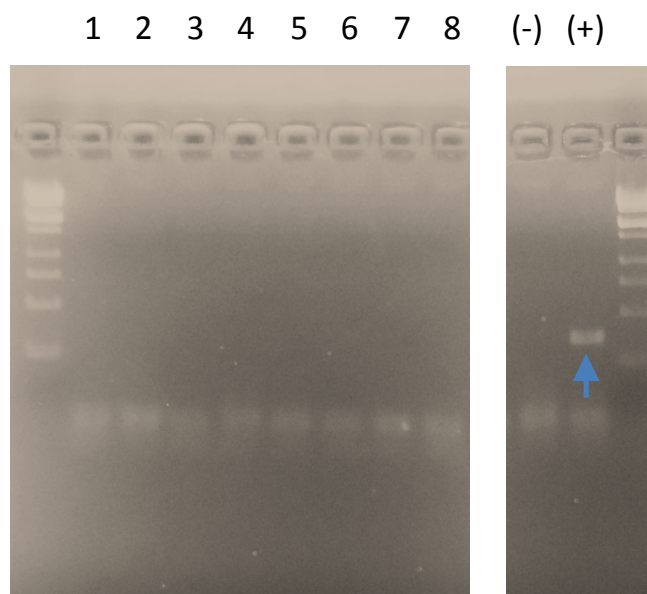
3.1. Theo dõi lợn sau khi gây miễn dịch

Kết quả theo dõi biến động thân nhiệt của lợn thí nghiệm sau khi gây miễn dịch được trình bày ở hình 1.

Lợn thí nghiệm có hiện tượng tăng thân nhiệt ở ngày thứ 1 và ngày thứ 2 sau khi gây miễn dịch. Ở ngày thứ 2 sau tiêm, nhóm lợn được gây miễn dịch tăng thân nhiệt rõ rệt so với nhóm đối chứng (tiêm chất bổ trợ không có kháng nguyên). Đến ngày thứ 5 sau tiêm, thân nhiệt của 2 nhóm lợn trở về mức bình thường và không có sự khác biệt. Cũng trong quá trình theo dõi này, không phát hiện thấy dấu hiệu bất thường của lợn thí nghiệm tại vị trí tiêm cũng như phản ứng toàn thân. Kết quả này chứng tỏ tính an toàn loại kháng nguyên thử nghiệm: không gây sốc trong quá trình tiêm, không gây phản ứng sau khi tiêm.



Hình 1. Thân nhiệt của lợn sau khi gây miễn dịch



Hình 2. Kết quả PCR phát hiện PCV2 bài thải qua phân

Ghi chú: Mẫu phân của lợn được gây miễn dịch bằng 3 chủng PCV2 vô hoạt (giếng 1-6) và của lợn đối chứng không gây miễn dịch (giếng 7-8); đối chứng âm (-) và đối chứng dương (+) của phản ứng PCR. Mũi tên chỉ vạch sản phẩm PCR đặc hiệu của đối chứng dương.

Bên cạnh việc theo dõi tình trạng của lợn sau gây miễn dịch, các mẫu phân đã được lấy mẫu xét nghiệm sự bài thải virus. Kết quả PCR phát hiện sự có mặt của PCV2 trong mẫu phân tại thời điểm 7 ngày sau gây miễn dịch đều cho kết quả âm tính (Hình 2).

PCV2 được xác định bài thải qua nhiều dịch bài xuất/ bài tiết của lợn như: nước bọt, nước tiểu và phân (Segales *et al.*, 2005). Kết quả gây nhiễm virus thực nghiệm cho lợn qua đường hô hấp (Shibata *et al.*, 2003) cho thấy PCV2 bài thải rất sớm qua phân (ngày thứ 1 sau gây nhiễm). Do vậy, kết quả PCR âm tính với PCV2 ở mẫu phân của lợn được gây miễn dịch (hình 2) cho thấy virus dùng gây miễn dịch đã được bất hoạt hoàn toàn và không có sự lưu hành PCV2 ở lô lợn thí nghiệm.

3.2. Đáp ứng miễn dịch của lợn

Phản ứng blocking ELISA với các mẫu huyết thanh của lợn được gây miễn dịch bởi 3 chủng PCV2 ở các ngày D7 đến D56 đã được thực hiện. Kết quả nghiên cứu biến động hiệu giá kháng thể đặc hiệu kháng PCV2 được trình bày ở hình 3.

Hình 3A và 3B biểu diễn giá trị S/N của mỗi mẫu huyết thanh, với giá trị ngưỡng dương tính/âm tính là 0,4. Tại thời điểm 14 ngày sau khi gây miễn dịch (D14) các mẫu xét nghiệm đều âm tính huyết thanh học với kháng thể kháng PCV2. Mẫu huyết thanh ở lô đối chứng (không tiêm kháng nguyên PCV2) tại tất cả các thời điểm xét nghiệm (D0- D56) đều âm tính huyết thanh học với kháng thể kháng PCV2. Tại thời điểm D21, toàn bộ các mẫu xét nghiệm (được gây miễn dịch bởi 3 chủng PCV2) đều dương tính huyết thanh học (giá trị S/N < 0,4). Kết quả trình bày ở hình 3A và 3B còn cho thấy hiện tượng chuyển dương tính huyết thanh học của lợn thí nghiệm diễn ra trong khoảng 14 đến 21 ngày kể từ thời điểm gây miễn dịch, kéo dài ít nhất đến ngày 56 (thời điểm dừng thí nghiệm). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của (Yang *et al.*, 2012): sau thời điểm tiêm vaccin 14 ngày đã bắt đầu phát hiện được kháng thể đặc hiệu kháng PCV2. Như vậy, kết quả cho thấy 3 chủng giống PCV2 ở các lần tiếp đời khác nhau đều có khả năng kích thích bản động vật sản sinh đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Ở các đời khảo sát trong nghiên cứu này, không phát hiện thấy

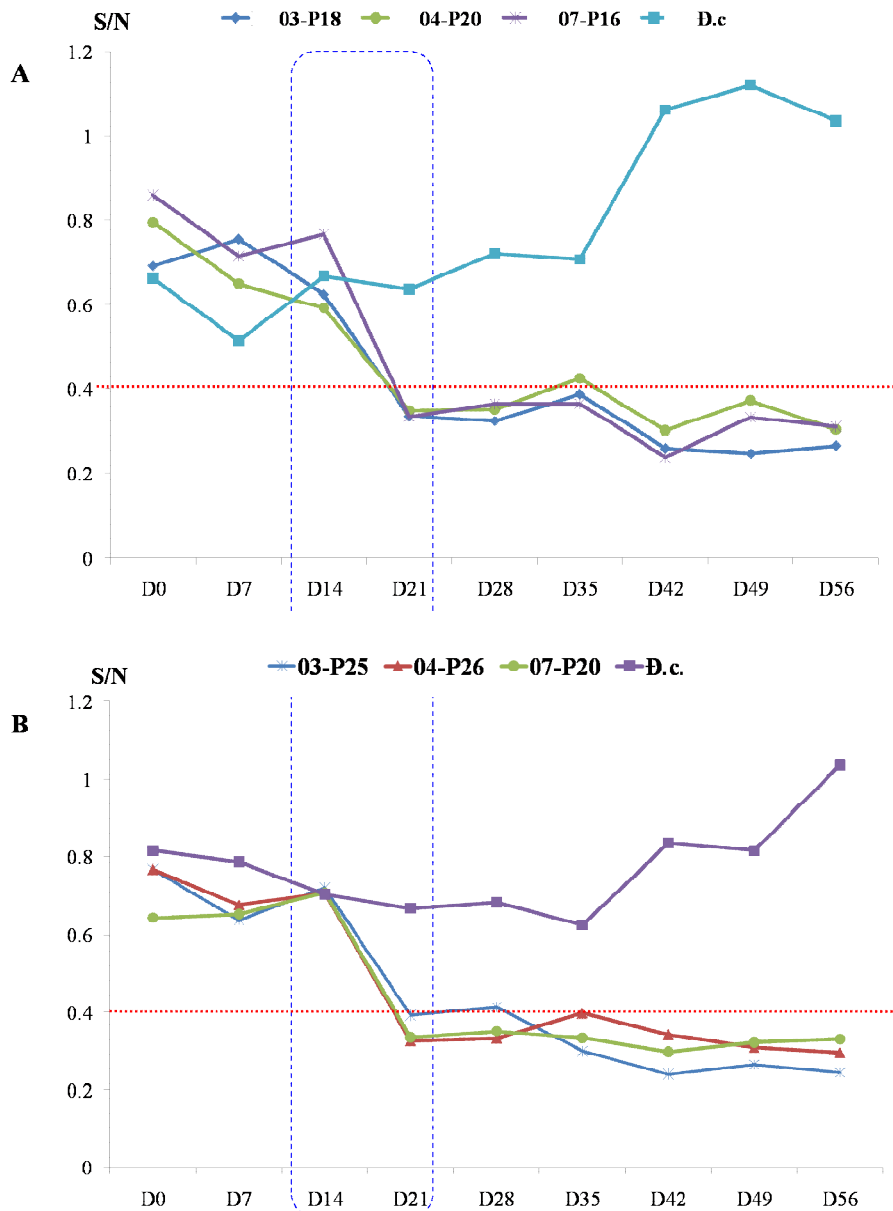
sự khác biệt về quy luật hình thành kháng thể (chuyển dương tính huyết thanh học diễn ra trong vòng 14- 21 ngày, giới hạn bởi đường nét đứt hình 3).

3.3. Khả năng trung hòa virus

Kết quả nghiên cứu đáp ứng miễn dịch dịch thể của lợn thí nghiệm với các chủng PCV2 bằng phương pháp blocking ELISA cho thấy giá trị

dương tính ở thời điểm D42 là cao nhất. Do vậy, huyết thanh của lợn thí nghiệm ở ngày D42 được chọn để thực hiện phản ứng trung hòa virus. Huyền dịch virus sau khi được trung hòa bởi huyết thanh được gây nhiễm vào 04 giếng tế bào (Bảng 1).

Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy sự sai khác về số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu (tế bào nhiễm virus) ở mẫu huyết thanh so



Hình 3. Biến động hiệu giá kháng thể của lợn sau gây miễn dịch với các chủng PCV2

Ghi chú: P16, P18, P20, P25, P26: lần tiếp đời của chủng PCV2 (03, 04 và 07) dùng gây miễn dịch cho lợn; D.c: lợn đối chứng không gây miễn dịch; D0-D56: ngày sau gây miễn dịch

Bảng 1. Kết quả trung hòa PCV2 của huyết thanh lợn sau gây miễn dịch

Giống	Huyết thanh lợn gây miễn dịch						Đối chứng virus
	Chủng 03		Chủng 04		Chủng 07		
	Đời 18	Đời 25	Đời 20	Đời 26	Đời 16	Đời 20	
A	2	0	0	1	2	1	23
B	1	0	0	0	0	2	26
C	0	0	1	1	0	1	26
D	2	2	2	1	0	0	29
Tổng/ giống	5/4	2/4	3/4	3/4	2/4	4/4	104/4

Ghi chú: Chữ số trong bảng là số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu (nhiễm virus)

với mẫu đối chứng virus ($p < 0,05$). Điều này chứng tỏ kháng thể đặc hiệu có khả năng trung hòa PCV2. Kết quả tính mức giảm số tế bào nhiễm virus cho thấy mẫu huyết thanh của lợn được gây miễn dịch bằng chủng PCV2 số 03 (đời 18), chủng 04 (đời 20), chủng 07 (đời 16) làm giảm lần lượt 20,8 lần; 34,6 lần và 52 lần số tế bào nhiễm virus so với đối chứng. Tương tự, mức giảm số tế bào nhiễm virus khi có mặt của huyết thanh của lợn được gây miễn dịch bằng chủng PCV2 số 03 (đời 25), chủng 04 (đời 26) và chủng 07 (đời 20) lần lượt là: 52 lần; 34,6 lần và 26 lần. Như vậy, huyết thanh lợn được gây miễn dịch bằng 3 chủng PCV2 trong nghiên cứu này đều có khả năng trung hòa PCV2 và không có sự sai khác ($p > 0,05$) về khả năng trung hòa virus của mẫu huyết thanh lợn được gây miễn dịch bởi các chủng giống PCV2 ở các đời khác nhau.

4. KẾT LUẬN

Ba chủng giống PCV2 dùng trong nghiên cứu này kích thích lợn sản sinh đáp ứng miễn dịch dịch thể trong vòng 14 đến 21 ngày và kháng thể đặc hiệu này có khả năng trung hòa virus. Không có sự khác biệt về quy luật hình thành kháng thể khi gây miễn dịch bởi 3 chủng giống PCV2 ở các lần tiếp đời khác nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Armstrong, D. and S. C. Bishop (2004). Does genetics or litters effect influence mortality in PMWS. Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, Hamburg, Germany, p. 809.
- Chae, C. (2012). Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in Korea. *Virus Res.*, 164(1-2): 107-113.
- Harding, J. (1996). Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Preliminary epidemiology and clinical presentation. Proceedings of the West Canadian Association of Swine Practitioners, p. 21.
- Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Mai Thị Ngân, Nguyễn Văn Giáp (2012). Xác định tỷ lệ lưu hành kháng thể huyết thanh kháng porcine circovirus type 2 (PCV2) ở đàn lợn nuôi tại một số tỉnh miền bắc. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, 19(7): 42-48.
- Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Lê Văn Phan, Nguyễn Văn Giáp, Trịnh Đình Thâu (2015). Lựa chọn chủng giống Porcine circovirus type 2 (PCV2) để sản xuất vaccin phòng hội chứng còi cọc ở lợn con. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(3): 406-415.
- Meerts, P., Misinzo, G., Lefebvre, D., Nielsen, J., Botner, A., Kristensen, C.S & Nauwynck, H. J. (2006). Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus type 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Vet Res.*, 2: 6-11.
- Murtaugh M.P., Tomasz Stadejek, Juan E. Abrahante, Tommy T.Y. Lam, Frederick C.C. Leung (2010). The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.*, 154(1-2): 18-30.
- Nguyễn Thị Thu Hồng, Phan Hoàng Dũng, Đặng Hùng, Nguyễn Tiến Hà, Chris Morrissey (2006). Bước đầu khảo sát về tình hình nhiễm PCV2 trên đàn heo nuôi ở một số tỉnh thành phía Nam. *Khoa học kỹ thuật thú y*, 13(3): 67- 69.
- Segales, J., M. Calsamiglia, A. Olvera, M. Sibila, L. Badiella and M. Domingo (2005). Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning

- multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol*, 111: 223-229.
- Shibata, I., Y. Okuda, S. Yazawa, M. Ono, T. Sasaki, M. Itagaki, N. Nakajima, Y. Okabe and I. Hidejima (2003). PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65: 405-408.
- Trương Anh Đức, Phạm Thị Nga, Nguyễn Thị Hồng Thắm và Nguyễn Việt Không (2015). Lưu hành của circovirus typ 2 ở lợn tại Hà Nội, Bắc Giang và Phú Thọ. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, 22(1): 32-40.
- Wensvoort G., Terpstra C., Pol J.M., ter Laak E.A., Bloemraad M., de Kluyver E.P., Kragten C., van Buiten L., den Besten A., Wagenaar F. (1991). Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q.* 13(3): 121-130
- Yang K., Wentao Li, Huihui Niu, Weidong Yan, Xiaoli Lui, Yang Wang, Shuang Cheng, Xugang Ku and Qigai He (2012). Efficacy of single dose of an inactivated porcine circovirus type 2 (PCV2) whole-virus vaccine with oil adjuvant in piglets. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54: 67.
- Yang J.S., Dae S. Song, So Y. Kim, Kwang S. Lyoo, Bong K. Park (2003). Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with or without enteric disease by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*, 15: 369-373.