

## LỰA CHỌN CHỦNG GIỐNG PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) ĐỂ SẢN XUẤT VACCIN PHÒNG HỘI CHỨNG CÒI CỌC Ở LỢN CON

Huỳnh Thị Mỹ Lệ\*, Lê Văn Phan, Nguyễn Văn Giáp, Trịnh Đình Thâu

*Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

*Email\* : huynhtml@yahoo.com*

Ngày gửi bài: 28.01.2015

Ngày chấp nhận: 18.04.2015

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này của chúng tôi nhằm tạo ra ngân hàng giống PCV2 đang lưu hành ở đàn lợn nuôi tại Việt Nam. Đây là những nghiên cứu bước đầu, phục vụ cho những nghiên cứu kế tiếp về vaccin phòng bệnh còi cọc ở lợn sau cai sữa do PCV2 gây ra. Đã có 07 chủng PCV2 phân lập được sử dụng để lựa chọn làm giống gốc sản xuất vaccin. Kết quả kiểm tra độ thuần khiết của virus phân lập cho thấy 100% chủng phân lập không tạp nhiễm với virus CSFV, PRRSV, PPV, PEDV, TGEV, PRV, PAdV và Mycoplasma. Khi kiểm tra với PCV1, có 2 chủng bị tạp nhiễm không đủ điều kiện làm giống gốc. Hiệu giá qua các lần tiếp đời của 05 chủng virus đạt độ thuần khiết trong nghiên cứu này dao động từ  $10^{2,00}$  TCID<sub>50</sub>/ 0,1ml đến  $10^{5,75}$  TCID<sub>50</sub>/ 0,1ml, trong đó 03 chủng PCV2 phân lập được có hiệu giá  $\geq 10^{5,00}$  TCID<sub>50</sub>/ 0,1ml.

Từ khóa: Chủng giống, Porcine circovirus type 2, vaccin.

### Selection of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Isolates for Development of Vaccine against Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome

### ABSTRACT

This study aimed to build up a collection of field isolates of Porcine circovirus type 2 (PCV2) circulating in pigs of Viet Nam. This is the first study for development of vaccine against post-weaning multi-systemic wasting syndrome, one of the most important Porcine circovirus type 2-associated diseases. Seven isolates of PCV2 were selected as candidates for subsequent evaluations. The purity test showed that 100% of PCV2 isolates were free of CSFV, PRRSV, PPV, PEDV, TGEV, PRV, PAdV and Mycoplasma. However, there were two out of seven isolates were contaminated with PCV1, and thus were not eligible for the production of master seed. The titers of five pure PCV2 isolates were in the range from  $10^{2,00}$  TCID<sub>50</sub>/ 0.1 ml to  $10^{5,75}$  TCID<sub>50</sub>/ 0.1 ml, of which the titers of three isolates were higher than  $10^{5,00}$  TCID<sub>50</sub>/ 0.1 ml.

Keywords: Porcine circovirus type 2, master seed, vaccine.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay ngành chăn nuôi lợn bị ảnh hưởng bởi nhiều tác nhân gây bệnh, gây thiệt hại kinh tế nặng nề, trong đó phải kể đến Porcine circovirus type 2 (PCV2). PCV2 được coi là nguyên nhân khởi phát gây các hội chứng liên quan tới PCV2 (Porcine circovirus type 2-associated disease, PCVAD). PCV2 có liên quan đến Hội chứng còi cọc ở lợn sau cai sữa

(postweaning multisystemic wasting syndrome - PMWS); Hội chứng viêm da và viêm thận (porcine dermatitis and nephropathy syndrome - PDNS); Bệnh đường hô hấp phức hợp ở lợn (porcine respiratory diseases complex) và Hội chứng rối loạn sinh sản ở lợn (porcine reproductive disorders).

Ở Việt Nam, hội chứng còi cọc ở lợn con sau cai sữa đã và đang gây thiệt hại kinh tế rất lớn cho ngành chăn nuôi lợn. Cho đến nay chúng ta

vẫn chưa có một đề tài nghiên cứu sản xuất vacxin phòng PMWS do PCV2 gây ra trên cơ sở sử dụng chủng virus vacxin từ chính những chủng virus phân lập được ngoài thực địa tại Việt Nam. Vì vậy, nghiên cứu này của chúng tôi nhằm để tạo ra ngân hàng giống PCV2 đang lưu hành gây bệnh ở đàn lợn nuôi tại Việt Nam. Đây là những nghiên cứu bước đầu, tạo ra nguồn vật

liệu phục vụ cho những nghiên cứu kế tiếp để sản xuất vacxin phòng PMWS.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Nguyên liệu

- Kit PCR i-StarMaster (iNtRON Biotechnology)

**Bảng 1. Trình tự môi dùng trong chẩn đoán và giám định genotype PCV2**

Môi xuôi/ngược	Loại môi	Trình tự môi (5' - 3')	Kích thước (bp)	Vị trí nucleotide	Tài liệu tham khảo
CV1/CV2	PCV2a, PCV2b	AGGGCTGTGGCCTTTGTTAC	989	1329 - 1348	Fenau et al., 2000
		TCTTCCAATCACGCTTCTGC		530 - 549	
VF2/VR2	PCV2a, PCV2b	GAAGAATGGAAGAAGCGG	360	62 - 79	Yang et al., 2003
		CTCACAGCAGTAGACAGGT		403 - 421	
2aF/VR2*	PCV2a	GGGTATAGAGATTTTGTGGTC	728	1460 - 1481	Kim et al., 2010
		CTCACAGCAGTAGACAGGT		403 - 421	
2bF/VR2*	PCV2b	CACAGAGCGGGGTTTGAGC	726	1462 - 1481	
		CTCACAGCAGTAGACAGGT		403 - 421	

Ghi chú: \* Sự kết hợp môi dùng xác định genotype của PCV2 được điều chỉnh bằng cách sử dụng môi ngược VR2 có trình tự phù hợp với các chủng PCV2 lưu hành ở Việt Nam.

**Bảng 2. Trình tự môi dùng để xác định sự tạp nhiễm virus và Mycoplasma**

Virus	Môi	Trình tự môi (5' - 3')	Kích thước (bp)	Vị trí nucleotide	TLTK
CSFV	CSFV-F	GTCGTCAGTAGTTCGACG	777	182 - 200	
	CSFV-R	ATGCTCTTTGGGGCTAT		959 - 941	
PRRSV	PRRSV-F	GAGTTTCAGCGGAACAATGG	451	14359 - 14379	Xu et al., 2012
	PRRSV-R	GCCGTTGACCGTAGTGGAG		14810 - 14791	
PPV	PPV-F	AGTTAGAATAGGATGCGAGGAA	265	1761 - 1782	
	PPV-R	AGAGTCTGTGGTGTATTTATTGG		2026 - 2002	
PEDV	PcF1	ACAAGTCTCGTAACCAGT	691	26971 - 26988	Kamau et al., 2010
	PcR1	GTATCACCACCATCAACAGC		27642 - 27661	
TGEV	T1	GTGGTTTTGTyrTAAATGC	859	16 - 35	Kim et al., 2001
	T2	CACTAACCAACGTGGARCTA		855 - 874	
MHP	MHP-2L	CCCTTTGTCTTAATTTTGGAA	808	102 - 123	Stärk et al., 1998
	MHP-2R	GCCGATTCTAGTACCCTAATCC		909 - 888	
PRV	PRV-F	GGGGTTGGACAGGAAGGACACCA	198	17205 - 17228	Xu et al., 2012
	PRV-R	AACCAGCTGCACGCGCTCAA		17403 - 17483	
PAdV	PALN	TACTGCMAGTTYCACATCCAGGT	344	20711 - 20733	Hundesä et al., 2006
	PARN	GGAATGGAGATGGGCAGGTT		21035 - 21054	
PCV1	PCV1-iF	CCTTCCGAGGAGGAGAAAAAC	491	879 - 900	Kim et al., 2003
	PCV1-oR	AAATTACGGGGCCCACTGGCT		1350 - 1369	

Lựa chọn chủng giống porcine circovirus type 2 (PCV2) để sản xuất vaccin phòng hội chứng còi cọc ở lợn con

- Chủng PCV2 phân lập tại Việt Nam
- ADN chuẩn của PCV2a và PCV2b do phòng thí nghiệm virus học, Trường đại học Thú y, Đại học Quốc gia Seoul (Hàn Quốc) cung cấp.
- Kít IFA đặc hiệu cho PCV2: VDP<sup>ro</sup>® PCV2 FA Reagent (Median Diagnostics, Hàn Quốc).
- Các cặp môi đặc hiệu dùng trong nghiên cứu này được lựa chọn dựa theo các nghiên cứu đã công bố trước đây, bao gồm: môi đặc hiệu chung và đặc hiệu genotype PCV2 (Bảng 1), môi đặc hiệu dùng cho phát hiện một số virus và Mycoplasma tạp nhiễm (Bảng 2).

## 2.2. Địa điểm nghiên cứu

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 nghiên cứu

### 2.3.1. Tách và tinh sạch ADN tổng số

ADN tổng số từ mẫu huyền dịch virus được thực hiện theo các bước sau: Ly giải mẫu bằng dung dịch sucrose/proteinase K; tách pha ADN bằng dung dịch phenol-chloroform-isoamyl (25: 24: 1); rửa ADN bằng iso-propanol; rửa rửa ADN bằng 1ml cồn 75% (pha trong nước cất đã xử lý bằng DEPC); sau đó hòa tan rửa ADN trong 30µl đệm TE (pH = 8,0). Các mẫu ADN sau tách chiết được dùng ngay hoặc bảo quản ở -70°C.

### 2.3.2. Tách và tinh sạch ARN tổng số

Các bước chiết tách ARN tổng số huyền dịch virus được thực hiện theo các bước sau: Ly giải mẫu bằng TRIzol® Reagent; tách pha ARN bằng chloroform; rửa ARN bằng iso-propanol; rửa rửa ARN bằng 1ml cồn 75% (pha trong nước cất đã xử lý bằng DEPC); sau đó hòa tan rửa ARN trong 30µl nước cất 3 lần đã xử lý bằng DEPC. ARN sau tách chiết được chuyển thành cDNA và bảo quản ở -70°C.

### 2.3.3. Tổng hợp cDNA

Đối với virus có bộ gen là ARN (CSFV, PRRSV, TGEV, PEDV), trước khi thực hiện phản ứng PCR, cần chuyển ARN thành ADN (sợi đơn) bằng phản ứng tổng hợp cDNA. Thành phần phản ứng (20µl) được trình bày trong bảng 3.

### 2.3.4. PCR

Nghiên cứu đã sử dụng kít PCR i-Star Master với các thành phần được phối hợp sẵn. Thể tích cuối cùng của phản ứng là 20µl gồm 17µl i-Star Master mix solution + 1µl mỗi xuôi + 1µl mỗi ngược + 1µl ADN mẫu tách chiết hoặc cDNA. Đối với phản ứng nested PCR, sản phẩm của phản ứng PCR vòng ngoài (cặp môi CV1/CV2) được pha loãng 100 lần trước khi được dùng làm sợi khuôn cho phản ứng PCR vòng trong (cặp môi VF2/VR2, 2aF/VR2 hoặc 2bF/VR2). Chu trình nhiệt tối ưu của các phản ứng PCR dùng trong nghiên cứu này được trình bày ở bảng 4.

Sản phẩm PCR được phân tích bằng phương pháp điện di trong thạch agarose 2%, có bổ sung lượng thuốc nhuộm phù hợp (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20,000x)).

**Bảng 3. Thành phần và chu trình nhiệt phản ứng tổng hợp cDNA**

Thành phần	Thể tích (µl)	Nhiệt độ (°C) (1 ÷ 2)	Nhiệt độ (°C) (3 ÷ 6)
ARN tổng số	10	65°C/ 5phút;	-
Random primer (10 pmole)	2	Giữ ở 4°C	-
dNTPs (40 mM)	1	-	25°C/ 5 phút;
DTT (0,1 M)	2	-	37°C/ 60 phút;
First strand buffer (5x)	4	-	72°C/ 10 phút;
M-MLV (200 U/µl)	1	-	Giữ ở 4°C

**Bảng 4. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR chẩn đoán PCV2**

Các giai đoạn của phản ứng	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giây)	Số vòng lặp
Tiền biến tính	94	180	1
Biến tính	94	15	40
Bắt mồi	50, 52, 54, 55, 56, 60*	20	
Kéo dài	72	60**	
Kéo dài cuối cùng	72	300	1

Ghi chú: \*: Nhiệt độ bắt mồi cho từng cặp mồi như sau: PcF1/PcR1 (50°C), MHP-2L/MHP-2R (52°C), 2aF/VR2 (52°C), 2bF/VR2 (52°C), PALN/PARN (54°C), VF2/VR2 (55°C), T1/T2 (55°C), CSFV-F/CSFV-R (56°C), PRRSV-F/PRRSV-R (56°C), PPV-F/PPV-R (56°C), PRV-F/PRV-R (56°C), PCV1-iF/PCV1-oR (60°C), CV1/CV2 (60°C); \*\* Đối với cặp mồi CV1/CV2, thời gian của giai đoạn kéo dài là 90 giây.

### 2.3.5. Miễn dịch huỳnh quang phát hiện PCV2 trên thảm tế bào

Việc khẳng định sự thích nghi và nhân lên của các chủng PCV2 phân lập được thông qua phát hiện capsid protein của virus bằng phản ứng IFA. Bộ kit sử dụng là VDPPro® PCV2 FA Reagent (Median Diagnostics, Hàn Quốc) với các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### 2.3.5. Thu hoạch và lưu giữ PCV2

Các chai tế bào sau gây nhiễm virus được thu ở thời điểm 96 giờ, tiến hành đông tan 03 lần ở -70°C, rồi loại bỏ cặn tế bào bằng cách ly tâm 4.000 vòng/phút/20 phút ở 4°C. Dịch nổi chứa virus được chia ra ống Eppendorf và bảo quản ở -70°C.

### 2.3.6. Xác định TCID<sub>50</sub>

Hiệu giá (TCID<sub>50</sub>/ml) được xác định theo phương pháp pha loãng tới hạn (End-point dilution assay). Tính toán giá trị TCID<sub>50</sub>/ 0,1ml theo công thức Spearman Karber:

$$\text{Log TCID}_{50} = (X_0 + d/2) - d \times (\sum ri/n)$$

Trong đó: X<sub>0</sub> là log của độ pha loãng virus cao nhất, d là log của bậc pha loãng, ri là số giếng tế bào âm tính (không có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu) ở mỗi độ pha loãng, n là số giếng tế bào được gây nhiễm ở mỗi độ pha loãng.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Lựa chọn mẫu PCV2 phân lập được

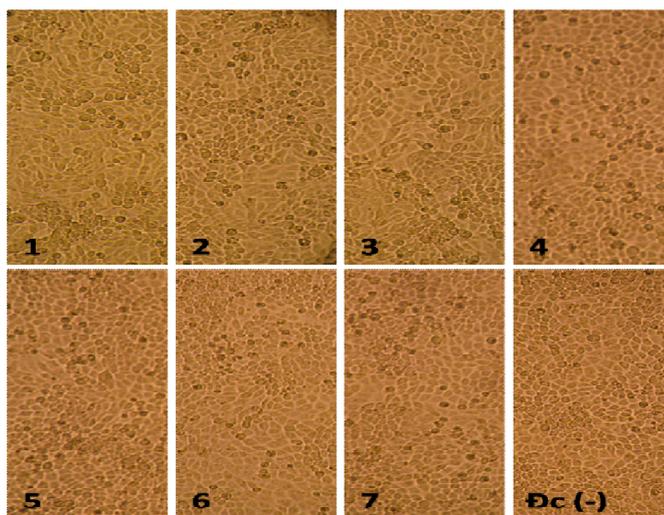
Để có nguồn mẫu xây dựng ngân hàng giống PCV2 phân lập được, trên cơ sở một số kết quả nghiên cứu của đề tài tiềm năng KC04.TN03/11-15, một số mẫu PCV2 cho nghiên cứu này đã được lựa chọn (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và Nguyễn Văn Giáp, 2013). Để tiện cho việc theo dõi, các nguồn mẫu được ký hiệu và thống kê trong bảng 5.

Trong quá trình phân lập virus trên môi trường tế bào PK15, ở các lần tiếp đời, đều thấy tế bào sau gây nhiễm phát triển bình thường, không quan sát được sự khác biệt giữa mẫu gây nhiễm và mẫu đối chứng âm. Hình 1 trình bày kết quả theo dõi biến đổi tế bào sau gây nhiễm 96 giờ, ở độ phóng đại 100 lần.

**Bảng 5. Nguồn mẫu để làm giống sản xuất vacxin PCV2**

Ký hiệu chủng số	Năm phân lập	Số lần tiếp đời	Triệu chứng, bệnh tích
1	2011-2012	3	Triệu chứng hô hấp, tiêu chảy
2	2011-2012	3	Bình thường
3	2011-2012	3	Mắc bệnh tai xanh, viêm da
4	2011-2012	3	Mắc bệnh tai xanh, viêm da
5	2011-2012	3	Còi cọc
6	2013	3	Còi cọc
7	2013	3	Triệu chứng hô hấp, còi cọc

Lựa chọn chủng giống porcine circovirus type 2 (PCV2) để sản xuất vaccin phòng hội chứng còi cọc ở lợn con



**Hình 1. Hình ảnh tế bào PK15 sau gây nhiễm 96 giờ (100X)**

Ghi chú: Kí hiệu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 là chủng phân lập.

### 3.2. Xác định genotype của các chủng PCV2 phân lập được

Phương pháp nested PCR đã được tối ưu hóa được lựa chọn để xác định được genotype của PCV2 trong 7 mẫu virus phân lập được. Kết quả được trình bày ở bảng 6, hình 2.

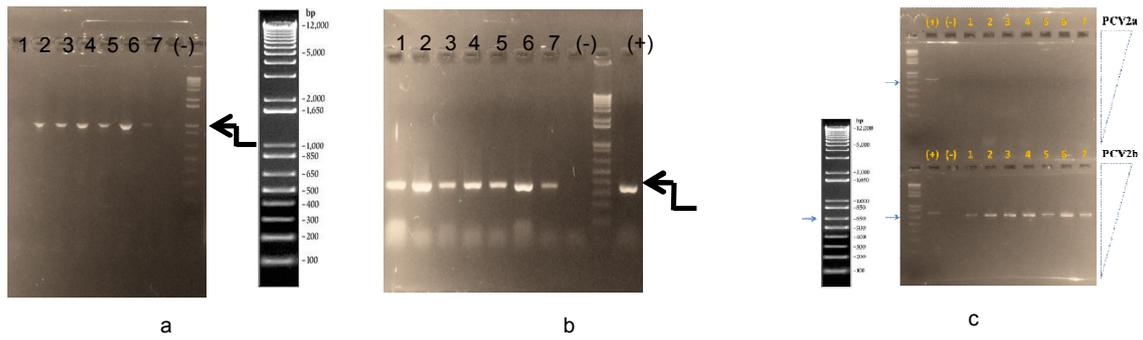
Hình 2 cho thấy, ở lần tiếp đời thứ 3, 05 mẫu phân lập số 2, 3, 4, 5 và 6 cho kết quả dương tính mạnh với PCV2 khi sử dụng cặp mồi CV1/CV2 nhân lên khoảng 1/2 bộ gen của PCV2. Cũng với các mẫu kể trên, kết quả nested PCR sử dụng cặp mồi VF2/VR2 nhân lên khoảng 0,2% bộ gen của PCV2 cho thấy 7/7 mẫu phân lập được đều dương tính với PCV2. Kết quả ở hình 2c cho thấy, 7/7 chủng PCV2 phân lập được

cho kết quả dương tính với PCV2b, không phát hiện được chủng phân lập nào dương tính với PCV2a. Như vậy, toàn bộ các chủng PCV2 phân lập được đều thuộc genotype PCV2b. Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu của các tác giả trên thế giới về sự chiếm ưu thế và vai trò gây bệnh của genotype PCV2b trong hội chứng liên quan tới PCV2 ở đàn lợn (Olvera et al., 2007; Kim et al., 2009; An et al., 2007; Allan et al., 2007). Điều này cũng rất có ý nghĩa và thuận lợi cho việc lựa chọn chủng để sản xuất vaccin phòng bệnh còi cọc ở lợn con, vì theo Opriessnig et al., (2013), vaccin sản xuất từ chủng virus thuộc genotype 2b cho hiệu quả phòng bệnh cao hơn vaccin sản xuất từ chủng virus thuộc genotype 2a.

**Bảng 6. Kết quả nested PCR chẩn đoán khẳng định PCV2 phân lập được**

Ký hiệu chủng số	Số lần tiếp đời	Kết quả PCR vòng ngoài (CV1/CV2, 989bp)	Kết quả nested PCR (VF2/VR2, 360bp)
1	3	(+)	+
2	3	+	+
3	3	+	+
4	3	+	+
5	3	+	+
6	3	+	+
7	3	(+)	+

Ghi chú: (+) dương tính yếu



**Hình 2. Kết quả xác định genotype PCV2 bằng phản ứng nested PCR**

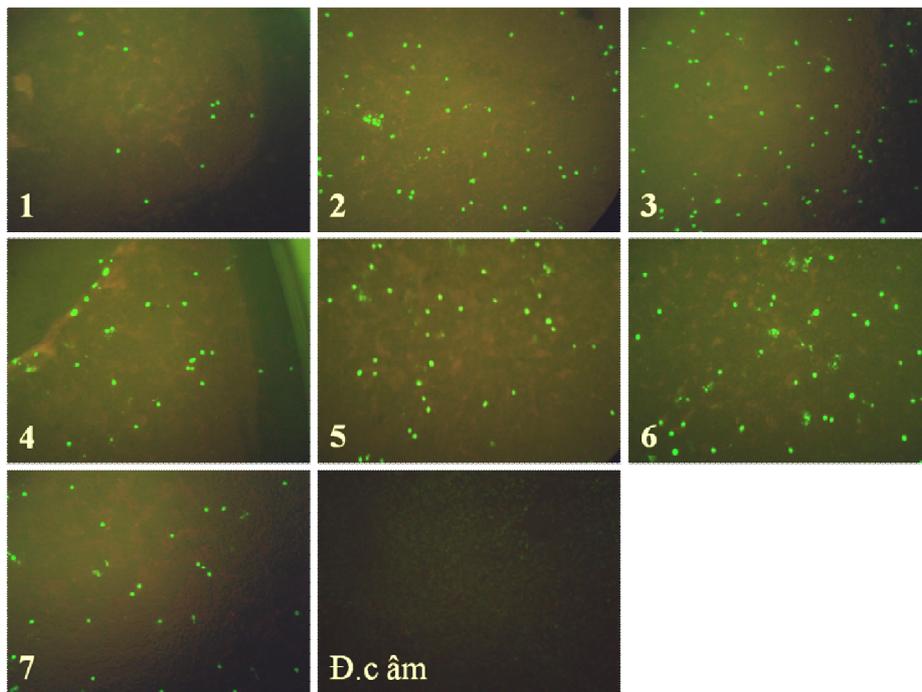
Ghi chú: a: nested PCR vòng ngoài; b: nested PCR vòng trong chung cho PCV2; c: nested PCR vòng trong giám định genotype. Ký hiệu giếng từ 1 đến 7 tương ứng với chủng phân lập. Mũi tên chỉ vạch tương đương của marker trên gel điện di và trên ảnh chuẩn của nhà sản xuất.

### 3.3. Xác định khả năng nhân lên của các chủng PCV2 ở môi trường tế bào PK15

Để chứng minh sự có mặt của virus sống trong môi trường tế bào, phản ứng miễn dịch huỳnh quang phát hiện kháng nguyên virus đã được thực hiện (tập trung trong nhân của tế bào nhiễm). Kết quả được trình bày ở hình 3.

Kết quả như trình bày trong hình 3 cho thấy, không phát hiện được tín hiệu huỳnh

quang ở các giếng đối chứng âm (không gây nhiễm virus). Ở các giếng gây nhiễm bằng các mẫu PCV2 phân lập, chúng tôi đều phát hiện thấy sự tập trung của tín hiệu huỳnh quang ở vị trí nhân tế bào, có dạng tròn hoặc dạng bầu dục rất rõ nét. Chỉ có một số ít tế bào có tín hiệu huỳnh quang ở nguyên sinh chất. Kết quả IFA một lần nữa khẳng định 07 virus phân lập được đều có khả năng nhân lên trên tế bào PK15 đã được sử dụng trong nghiên cứu này.



**Hình 3. Kết quả IFA phát hiện PCV2 trong mẫu phân lập**

Ghi chú: Ký hiệu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 là các chủng phân lập.

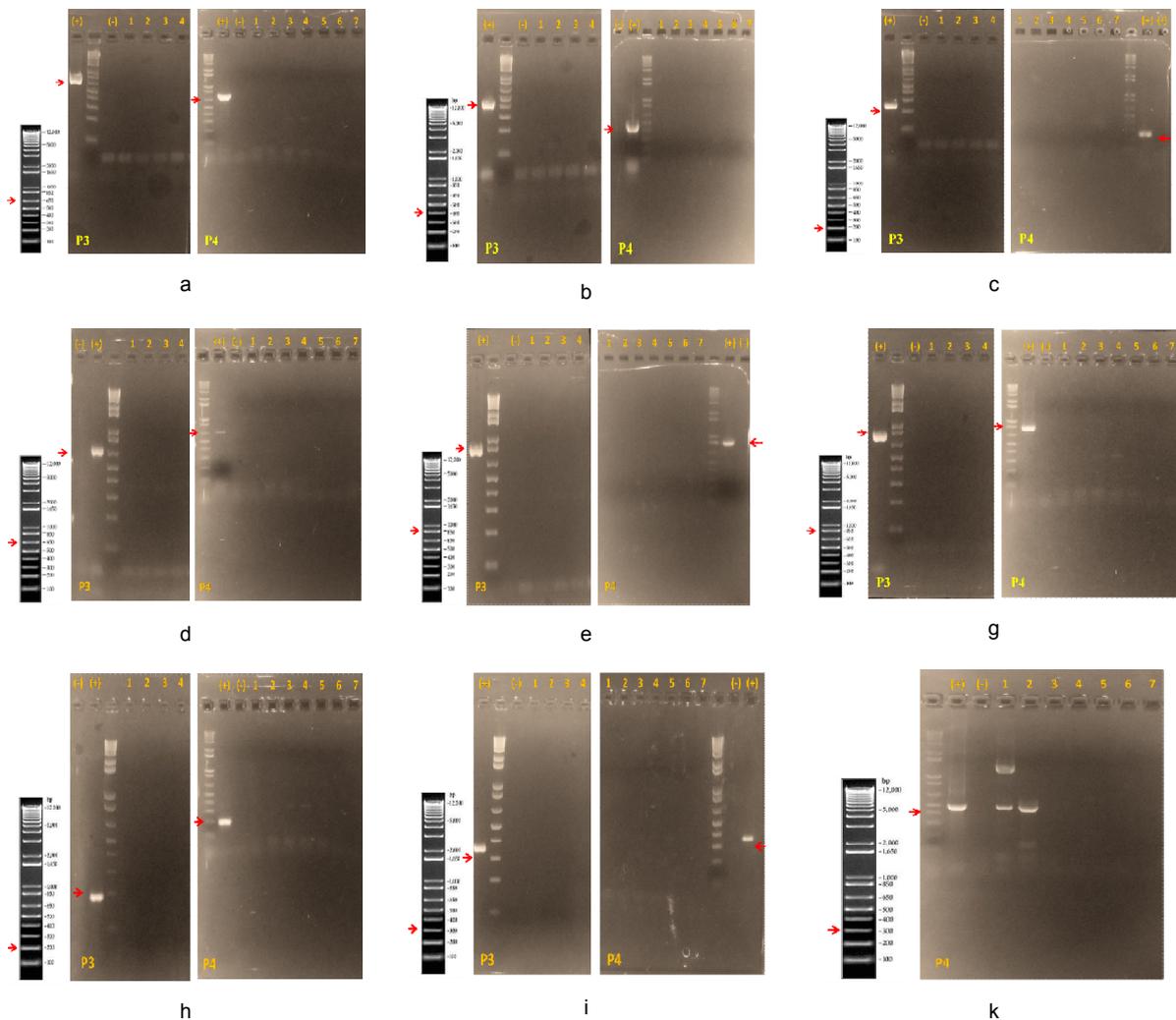
Lựa chọn chủng giống porcine circovirus type 2 (PCV2) để sản xuất vaccin phòng hội chứng còi cọc ở lợn con

### 3.4. Giám định độ thuần khiết của PCV2 phân lập được

Đề tài cũng đã kiểm tra độ thuần khiết của PCV2 phân lập được với một số virus và Mycoplasma thường lưu hành ở đàn lợn, có khả năng nhân lên trên tế bào PK15, bao gồm: CSFV, PRRSV, PPV, PEDV, TGEV, PRV, PAdV, PCV1 và MHP. Kết quả giám định độ thuần khiết được thực hiện qua lần tiếp đời thứ 3 (P3) và thứ 4 (P4), được trình bày như hình 4.

Kết quả ở hình 4 cho thấy, các mẫu đối chứng dương đều cho vạch đặc hiệu có kích thước như

thiết kế. Trong khi đó, đều không quan sát được vạch đặc hiệu ở mẫu đối chứng âm. Do đó, các phản ứng PCR đều hoạt động tốt và không có hiện tượng tạp chéo giữa các phản ứng. Ở các mẫu xét nghiệm (lần tiếp đời thứ 3, thứ 4), không thấy có vạch PCR đặc hiệu đối với 8 loại virus/ Mycoplasma được xét nghiệm (Hình 4a,h). Kết quả ở hình 4i (phát hiện tạp nhiễm PCV1) cho thấy mẫu phân lập số 1 và số 2 cho vạch PCR đặc hiệu tương đương với đối chứng dương. Ở 05 mẫu phân lập còn lại không phát hiện dương tính với PCV1. Như vậy, kết quả kiểm tra thuần



Hình 4. Kết quả PCR sự tạp nhiễm virus, Mycoplasma ở các mẫu PCV2 phân lập

Ghi chú: a: CSFV, b: PRRSV, c: PPV, d: PEDV, e: TGEV, g: MHP, h: PRV, i: PAdV và k: PCV1. Ký hiệu giống từ 1 đến 7 tương ứng với chủng phân lập ở lần tiếp đời thứ 3 (P3) và đời thứ 4 (P4). Mũi tên chỉ vạch tương đương của marker trên gel điện di và trên ảnh chuẩn của nhà sản xuất)

khiết cho thấy có 05 chủng phân lập (số 3, 4, 5, 6 và 7) đều đạt tiêu chuẩn thuần khiết. Có 2 mẫu phân lập (số 1 và 2) tạp nhiễm PCV1.

### 3.5. Chuẩn độ PCV2 phân lập được

Hiệu giá 05 chủng PCV2 phân lập được, đạt tiêu chuẩn thuần khiết, ở các đời khác nhau đã được xác định và trình bày ở bảng 7.

Kết quả cho thấy,  $10^{-6}$  là độ pha loãng virus lớn nhất ở đó vẫn phát hiện thấy tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu. Hiệu giá qua các lần tiếp đời của 05 chủng virus trong nghiên cứu này dao động từ  $10^{2,00}$  TCID<sub>50</sub>/ 0,1ml đến  $10^{5,75}$  TCID<sub>50</sub>/ 0,1ml. So sánh giữa các lần tiếp đời có thể nhận thấy chủng phân lập số 03, 04 và 07 có sự tăng về hiệu giá. Trong khi đó, chủng phân lập số 05 và 06, sự tăng về hiệu giá là chưa rõ ràng ở các đời khảo sát trong nghiên cứu này. Hình 5 minh họa kết quả IFA xác định hiệu giá TCID<sub>50</sub> cho chủng phân lập số 03, ở lần tiếp đời 25.

Như vậy, với các điều kiện về chất bổ trợ và dòng tế bào PK15 đã được sử dụng, nghiên cứu đã xác định được 03 chủng PCV2 phân lập được có hiệu giá  $\geq 10^{5,00}$  TCID<sub>50</sub>/ 0,1ml là các chủng

số 03 ( $10^{5,75}$ , đời 25), chủng số 04 ( $10^{5,50}$ , đời 20) và chủng số 07 ( $10^{5,25}$ , đời 16). Đây là hiệu giá virus phân lập đủ điều kiện để sản xuất vaccin thử nghiệm.

## 4. KẾT LUẬN

Từ những kết quả như đã trình bày, có thể rút ra một số kết luận sau:

- Đã phân lập được 07 chủng PCV2 từ thực địa làm nguồn mẫu cho nghiên cứu lựa chọn chủng để sản xuất vaccin phòng bệnh do PCV2 gây ra.

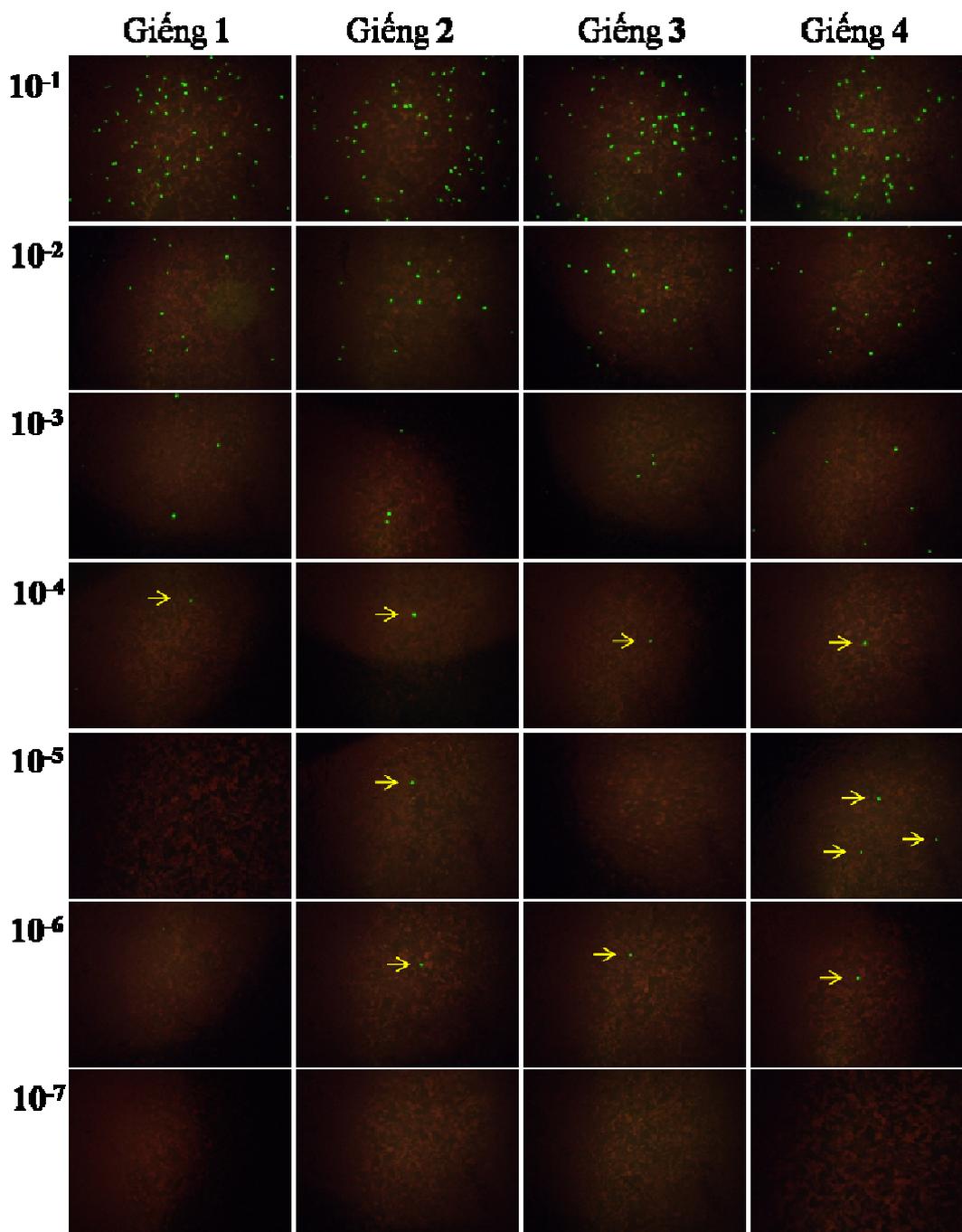
- Bằng phương pháp nested PCR và miễn dịch huỳnh quang đã xác định được 07 chủng phân lập thuộc genotype PCV2b và khẳng định được sự có mặt của PCV2 trong 7/7 mẫu phân lập.

- Kết quả kiểm tra độ thuần khiết với một số mầm bệnh thường lưu hành gây bệnh ở lợn, có khả năng phát triển trên môi trường tế bào PK15 cho thấy: 7/7 mẫu phân lập âm tính với CSFV, PRRSV, PPV, PEDV, TGEV, MHP, PRV và PAdV; có 02 trong số 07 mẫu phân lập tạp nhiễm PCV1.

**Bảng 7. Hiệu giá TCID<sub>50</sub> của các chủng virus phân lập được**

Chủng phân lập	Lần cấy chuyển (đời)	Số giếng dương tính/ tổng số giếng gây nhiễm ở mỗi độ pha loãng							TCID <sub>50</sub> / 0,1ml
		$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	
03	11	4/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	2,00
	14	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4	0/4	0/4	4,75
	18	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	0/4	0/4	5,00
	25	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	3/4	0/4	5,75
04	11	4/4	4/4	2/4	1/4	0/4	0/4	0/4	3,25
	20	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	1/4	0/4	5,50
05	08	4/4	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	2,50
	10	4/4	4/4	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4	3,25
	11	4/4	4/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	2,75
06	07	4/4	4/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	2,75
	08	4/4	4/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	3,00
	11	4/4	4/4	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4	3,50
	12	4/4	4/4	2/4	1/4	0/4	0/4	0/4	3,25
07	07	4/4	4/4	2/4	2/4	0/4	0/4	0/4	3,50
	14	4/4	4/4	4/4	1/4	0/4	0/4	0/4	3,75
	16	4/4	4/4	4/4	3/4	3/4	1/4	0/4	5,25

Lựa chọn chủng giống porcine circovirus type 2 (PCV2) để sản xuất vacxin phòng hội chứng còi cọc ở lợn con



**Hình 5. Kết quả xác định TCID<sub>50</sub> của chủng phân lập 03, đời 25 (100X)**

*Ghi chú: Tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu là các điểm sáng trên ảnh. Ở độ pha loãng cao, mũi tên chỉ tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.*

- Hiệu giá qua các lần tiếp đời của 05 chủng virus đạt độ thuần khiết trong nghiên cứu này dao động từ  $10^{2,00}$  TCID<sub>50</sub>/ 0,1 ml đến  $10^{5,75}$  TCID<sub>50</sub>/ 0,1 ml, trong đó 03 chủng PCV2 phân lập được có hiệu giá  $\geq 10^{5,00}$  TCID<sub>50</sub>/ 0,1 ml.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

An DJ, Roh IS, Song DS, Park CK and Park BK (2007). Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus Research*, 129: 115-122.

- Allan GM, McNeilly F, McMenamy M, McNair I, Krakowka SG, Timmusk S, Walls D, Donnelly M, Minahin D, Ellis J, Wallgren P, and Fossum C (2007). Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome affected and nonaffected farms in Ireland and Northern Ireland. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19: 668-673.
- Fenaux, M., P. G. Halbur, M. Gill, T. E. Toth, and X. J. Meng (2000). Genetic characterization of type 2 Porcine circovirus (PCV-2) from pigs with Postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J. Clin. Microbiol.*, 38:2494-2503.
- Hundesda Ayalkibet, Carlos Maluquer de Motes, Silvia Bofill-Mas, Nestor Albinana-Gimenez and Rosina Girones (2006). Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl Environ Microbiol.*, 72(12): 7886- 7893.
- Kamau N.A., Park J.Y., Park J.E., Hyun B.H., Yang D.K., Song J.Y. and Shin H.J. (2010). Susceptibility of Mice to porcine epidemic diarrhea virus. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(24): 3114-3116.
- Katharina D.C Stärk, Jacques Nicolet, and Joachim Frey (1998). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *Appl Environ Microbiol.*, 64(2): 543- 548.
- Kim D, Y. Ha, Y. Oh, C. Chae (2010) Prevalence of porcine circovirus types 2a and b in pigs with and without post-weaning multi-systemic wasting syndrome. *The veterinary journal*, doi: 10.1016/j.tvjl.2010.02.006.
- Kim HH, Park SI, Hyun BH, Park SJ, Jeong YJ, Shin DJ, Chun YH, Hosmillo M, Lee BJ, Kang MI, and Cho KO (2009). Genetic diversity of porcine circovirus type 2 in Korean pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome during 2005-2007. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71: 349-353.
- Kim, JH, Chee, H, (2003). Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res*, 67: 133-137.
- Kim So.Y., Dae S. Song, Bong K. Park (2001). Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J Vet Diagn Invest*, 13: 516-520.
- Huỳnh Thị Mỹ Lệ và Nguyễn Văn Giáp (2013) Phân lập và xác định một số đặc tính sinh học của porcine circovirus type 2 (PCV2) ở đàn lợn nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam *Tạp chí khoa học và phát triển*, 11(3): 304-309.
- Olvera A, Cortey M and Segalés J (2007). Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology*, 357: 175-185.
- Opriessnig, T., O'Neill, K., Gerber, P.F., de Castro, A.M., Gimenez-Lirola, L.G., Beach, N.M., Zhou, L., Meng, X.J., Wang, C. and Halbur, P.G. (2013). A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection. *Vaccine*, 31: 487-94.
- Yang Jeong S. , Song Dae S., Kim So Y., Lyoo Kwang S., Park Bong K. (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.
- Xu, X.G., Chen, G.D., Huang, Y., Ding, L., Li, Z.C., Chang, C.D., Wang, C.Y., Tong, D.W., Liu, H.J. (2012). Development of multiplex PCR for simultaneous detection of six swine DNA and RNA viruses. *Journal of Virological Methods*, 183: 69-74.