

MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA CHỦNG PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) SAU BẢO QUẢN BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐÔNG KHÔ

Trần Thị Hà¹, Nguyễn Văn Giáp², Lê Văn Phan²,
Tạ Thị Kim Chung², Hoàng Minh², Huỳnh Thị Mỹ Lệ²

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm xác định một số đặc tính sinh học của virus PCV2 sau bảo quản bằng phương pháp đông khô. Kết quả xác định hiệu giá virus bằng phản ứng IFA cho thấy sau đông khô, 3 chủng PCV2 được lựa chọn làm giống sản xuất vaccin có hiệu giá dao động từ $10^{4.5}$ TCID₅₀/0,1ml đến $10^{5.25}$ TCID₅₀/0,1ml. So với hiệu giá virus trước đông khô, chúng tôi nhận thấy có sự giảm về hiệu giá virus, tuy nhiên hiệu giá virus này vẫn đảm bảo đủ điều kiện làm giống để sản xuất vaccin. Khi gây nhiễm cho lợn thấy rằng cả 3 chủng PCV2 đông khô đều có khả năng kích thích bản động vật sản sinh đáp ứng miễn dịch đặc hiệu, với hiện tượng chuyển dương tính huyết thanh học xảy ra trong vòng 7- 14 ngày sau gây nhiễm.

Từ khóa: PCV2, Đông khô, Hiệu giá, Đặc tính sinh học

Investigation on some biological characteristic of Porcine circovirus type 2 (PCV2) strains after lyophilization

Tran Thi Ha, Nguyen Van Giap, Le Van Phan,
Ta Thi Kim Chung, Hoang Minh, Huynh Thi My Le

SUMMARY

The objective of this study aimed at investigating some biological characteristics of PCV2 strains after lyophilization. By using IFA method, the viable titers of PCV2 were in the range of $10^{4.5}$ TCID₅₀/0,1ml to $10^{5.25}$ TCID₅₀/0,1ml. These titers were lower than the viral titers before lyophilization. These titers, however were still adequate for vaccine production. Result of experimental infection for pigs with the reconstituted viruses indicated that 3 PCV2 strains were able to induce specific immune responses. Of which, sero-conversions occurred within 7 to 14 days after infection.

Keywords: PCV2, Lyophilization, Titer, Biological characteristic

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Porcine circovirus type 2 (PCV2) lưu hành ở hầu hết các nước chăn nuôi lợn trên thế giới, được coi là nguyên nhân gây nên nhiều bệnh ở lợn, trong đó phải kể đến hội chứng còi cọc ở lợn sau cai sữa (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome - PMWS) (Opriessnig và cs., 2007). Bệnh thường xảy ra ở lứa tuổi sau cai sữa với triệu chứng điển hình là còi cọc, chậm lớn, kèm theo da nhợt nhạt, viêm phổi, tiêu chảy và có tỉ lệ chết khoảng 10-15%

hoặc đôi khi còn cao hơn. Đặc biệt nguy hiểm là PCV2 kết hợp với một số virus khác như virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus), virus cúm lợn (Swine influenza virus), virus dịch tả lợn (Classical swine fever virus) khiến cho lợn nhiễm virus bị suy giảm miễn dịch, dễ cảm nhiễm với các vi khuẩn kế phát gây bệnh (Segales và cs., 2004).

Thực tế nhiều trại chăn nuôi trong nước đã nhận thấy mức độ ảnh hưởng và nguy cơ do PCV2 gây ra cho đàn lợn nên đã áp dụng các biện pháp phòng bệnh nghiêm ngặt. Cùng với

¹ Học viên cao học K23, Khoa Thú y, HVNNVN

² Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

công tác vệ sinh phòng bệnh thì người chăn nuôi đã rất có ý thức trong việc sử dụng vaccin, do đó nhu cầu sử dụng vaccin phòng bệnh còi cọc ở lợn con rất cao; tuy nhiên vaccin được sử dụng hiện nay đều là ngoại nhập. Trước đòi hỏi của thực tiễn, chúng tôi tiến hành nghiên cứu chọn chủng PCV2 để làm giống gốc sản xuất vaccin phòng bệnh còi cọc ở lợn con. 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 virus PCV2 thuần khiết, có hiệu giá $\geq 10^{5,00}$ TCID₅₀/0,1 ml làm giống gốc để chế vaccin phòng bệnh (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cs., 2015).

Một trong những nội dung cần thực hiện là nghiên cứu bảo quản giống virus vaccin. Phương pháp đông khô nhằm mục đích bảo quản lâu dài virus là phương pháp tối ưu được lựa chọn. Tuy nhiên, việc bảo quản có ảnh hưởng gì đến virus PCV2 đã được lựa chọn làm giống vaccin hay không; bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu đặc tính sinh học của virus PCV2 sau bảo quản bằng phương pháp đông khô.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Kiểm tra hiệu giá giống gốc vaccin PCV2 sau đông khô.
- Kiểm tra đặc tính sinh miễn dịch của giống gốc vaccin PCV2 sau đông khô.

2.2. Nguyên liệu

- 3 chủng virus PCV2 đông khô, kí hiệu chủng 03, 04 và 07
- Kit IFA (VDPro PCV2 FA Reagent, Median Diagnostics, Hàn Quốc)
- Hóa chất dùng tách chiết ADN tổng số gồm: (i) dung dịch ly giải mẫu có chứa 27% sucrose, 15 mM trisodium citrate, 0,15 M NaCl, 1 mM ethylene diaminetetraacetic acid, 1% sodium dodecyl sulphate, 200 µg/ml proteinase K; (ii) phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1); (iii) isopropyl; (iv) cồn 70%; (v) dung dịch đệm TE (pH=8)

- Kit PCR (i-StarMaster, iNtRON Biotechnology, Hàn Quốc)

- Cặp mồi đặc hiệu cho PCV2 có trình tự:
VF2: 5'-GAAGAATGGAAGAAGCGG-3',
VR2: 5'-CTCACAGCAGTAGACAGGT-3' (Yang và cs., 2003)

- Kit blocking ELISA (SERELISA PCV2 Ab Mono Blocking, Synbiotics).

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Phương pháp xác định TCID₅₀

Các bước được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được tóm tắt như sau: (i) cố định thảm tế bào bằng methanol lạnh, (ii) hydrate hóa tế bào bằng PBS 1x, (iii) ủ kháng thể kháng PCV2, (iv) ủ kháng thể kháng thể gắn huỳnh quang, (v) đọc kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang ở độ phóng đại 100 lần. Hiệu giá (TCID₅₀/ml) của 3 chủng virus đông khô được xác định theo phương pháp pha loãng tới hạn (End-point dilution assay). Tính toán giá trị TCID₅₀/0,1ml theo công thức Spearman- Karber:

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

Trong đó: X_o 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.

2.3.2 Phương pháp PCR phát hiện PCV2

Sự nhân lên và bài thải PCV2 của lợn sau khi gây nhiễm bằng các chủng PCV2 đông khô được phát hiện ở các loại mẫu: huyết thanh, dịch miệng và phân. ADN tổng số được tách và tinh sạch theo các bước tóm tắt sau: (i) ly giải mẫu bằng dung dịch sucrose/proteinase K, (ii) tách pha ADN bằng phenol- chloroform- isoamyl, (iii) rửa và rửa ADN. Sự có mặt của PCV2 được xác định bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu VF2/VR2 (Yang và cs., 2003). Sản phẩm PCR được phân tích bằng phương pháp điện di trong agarose 2%, nhuộm bằng RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (1x).

2.3.3 Phương pháp blocking ELISA phát hiện kháng thể kháng PCV2

Phản ứng blocking ELISA phát hiện kháng thể đặc hiệu kháng PCV2 trong mẫu huyết thanh của lợn thí nghiệm được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng được đánh giá đạt yêu cầu 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 là dương tính huyết thanh học; ngược lại nếu $S/N > 0,4$, mẫu được đánh giá là âm tính huyết thanh học.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

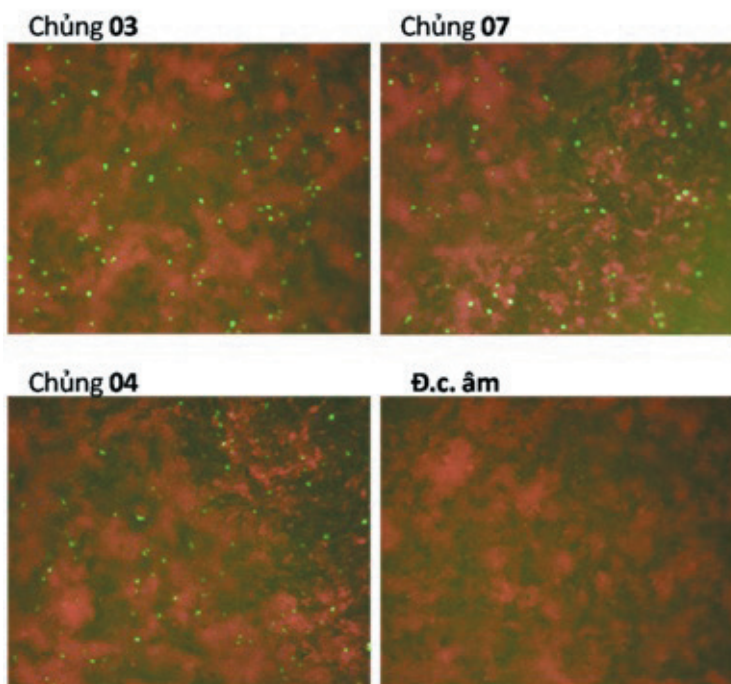
Với mục đích lựa chọn được chủng PCV2 làm giống để sản xuất vacxin phòng bệnh còi cọc ở lợn con, đề tài cấp Nhà nước KC.04.22/11-15 đã chọn được 3 chủng PCV2 với đặc điểm: thuần khiết, ổn định di truyền và ổn định tính kháng nguyên. Nghiên cứu sự biến động hiệu giá cho thấy 3 chủng virus kể trên có (i) hiệu giá cao (chủng 03, 04 và 07 đạt hiệu giá $> 10^5$ TCID₅₀/0,1 ml sau các lần tiếp đời lần lượt là

14, 20 và 16) và (ii) các chủng virus này có hiệu giá ổn định (biến động không vượt quá 1 log) trong phạm vi đời 18 đến đời 26 (chủng 03), đời 20 đến đời 26 (chủng 04) và đời 16 đến đời 26 (chủng 07). Để có thể bảo quản giống virus một thời gian dài, chúng tôi sử dụng phương pháp đông khô (theo quy trình của công ty Vetvaco), với sữa tách bơ được bổ sung theo tỷ lệ 1:1. Trong nghiên cứu này, chủng giống PCV2 được đông khô và nghiên cứu một số đặc tính sinh học sau đông khô là: chủng 03 ($10^{5,75}$ TCID₅₀/0,1 ml, đời 25), chủng 04 ($10^{5,50}$ TCID₅₀/0,1 ml, đời 20) và chủng 07 ($10^{5,50}$ TCID₅₀/0,1 ml, đời 16). Kết quả kiểm tra hiệu giá và tính sinh miễn dịch của virus sau đông khô được trình bày trong các nội dung dưới đây.

3.1. Kết quả kiểm tra hiệu giá giống gốc vacxin PCV2 sau đông khô

Để phát hiện sự có mặt và nhân lên của virus, chúng tôi thực hiện phản ứng IFA với thăm tế bào sau gây nhiễm bởi 3 chủng PCV2 đông khô.

Hình 1 là kết quả IFA ở độ pha loãng 10^{-2} của 3 chủng giống đông khô.



Hình 1. Kết quả IFA của 3 chủng giống PCV2 đông khô

Có thể thấy rằng, ở giếng đối chứng âm (không có virus), không thấy xuất hiện tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu. Trong khi đó ở các giếng gây nhiễm bằng chủng PCV2 đông khô (số 03, 04 và 07), chúng tôi thấy có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu (đốm màu xanh, hình 1). Ở cả 3 chủng virus, chúng tôi đều thấy tín hiệu huỳnh

quang tập trung rất rõ ở trong nhân của tế bào. Như vậy, bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang, đã xác định được 3 chủng PCV2 đông khô là virus sống, có khả năng nhân lên trong môi trường tế bào PK15. Hiệu giá virus của 3 chủng giống đông khô được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Hiệu giá TCID₅₀ của giống PCV2 đông khô

Kí hiệu chủng giống	Đời virus đông khô	Số giếng dương tính/ tổng số giếng gây nhiễm ở mỗi độ pha loãng							Log TCID ₅₀ / 0,1ml
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
03	25	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	0/4	0/4	5,25
04	20	4/4	4/4	4/4	3/4	2/4	0/4	0/4	4,75
07	16	4/4	4/4	4/4	3/4	1/4	0/4	0/4	4,50

Kết quả cho thấy 10⁻⁵ là độ pha loãng virus lớn nhất ở đó vẫn phát hiện thấy tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu. Áp dụng công thức Spearman-Kärber, hiệu giá của 3 chủng virus đông khô dao

động từ 10^{4,5} TCID₅₀/ 0,1 ml đến 10^{5,25} TCID₅₀/ 0,1 ml. So sánh hiệu giá của chủng PCV2 (ở cùng lần tiếp đời virus) giữa thời điểm trước và sau đông khô, chúng tôi có kết quả trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Hiệu giá của chủng PCV2 trước và sau đông khô

Kí hiệu chủng giống	Hiệu giá (Log TCID ₅₀ / 0,1ml)	
	Trước đông khô	Sau đông khô
03	5,75	5,25
04	5,50	4,75
07	5,50	4,50

So với hiệu giá virus trước đông khô, chúng tôi thấy có sự giảm về hiệu giá virus. Mức giảm hiệu giá là cao nhất (1 log) đối với chủng 07. So sánh với hiệu giá virus dùng chế vaccin PCV2 vô hoạt (TCID₅₀/0,1 ml $\geq$ 10⁵) của một số nghiên cứu đã công bố (Li và cs., 2015), hiệu giá virus đông khô vẫn đảm bảo đủ điều kiện làm giống để sản xuất vaccin.

3.2. Kiểm tra sự ổn định tính kháng nguyên của giống vaccin PCV2 sau đông khô

Trong nghiên cứu này chúng tôi dùng bản động vật (lợn) và chủng virus sống được hoàn nguyên để nghiên cứu đặc tính kháng nguyên của 3 chủng PCV2 đông khô. Lợn sử dụng trong các thí nghiệm được kiểm tra đảm bảo âm tính kháng thể và virus PCV2. Lợn thí nghiệm được gây nhiễm bằng 2 ml huyền dịch virus (10⁵ TCID₅₀/ml) theo đường tiêm bắp. Để khẳng định việc gây nhiễm thành công, chúng tôi thực hiện phản ứng PCR để phát hiện sự nhân lên và bài thải PCV2 ở lợn sau gây nhiễm (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả PCR xác định sự có mặt của PCV2 ở lợn sau gây nhiễm

Ngày	Huyết thanh	Dịch miệng	Phân
Ngày 0	-	-	-
Ngày thứ 8	+	+	+
Ngày thứ 9	+	ND	ND
Ngày thứ 10	+	ND	ND
Ngày thứ 11	+	ND	ND
Ngày thứ 17	+	-	+
Ngày thứ 19	+	ND	ND
Ngày thứ 23	+	-	-

Ghi chú: 0 là thời điểm gây nhiễm PCV2, 1- 23 là các ngày sau khi gây nhiễm. Phản ứng PCR dương tính (+), âm tính (-) và chưa xét nghiệm (ND).

Với kết quả trình bày ở bảng 3, kể từ ngày thứ 8, phản ứng PCR phát hiện PCV2 trong máu đều cho kết quả dương tính. Bên cạnh đó, chúng tôi cũng thấy mẫu dịch miệng và mẫu phân dương tính với PCV2 (ở ngày thứ 8). Kết quả

trên chứng tỏ lợn sau gây nhiễm PCV2 đã có hiện tượng bài thải virus.

Đáp ứng miễn dịch dịch thể đặc hiệu kháng PCV2 được đánh giá bằng phản ứng blocking ELISA với kết quả được trình bày ở bảng 4 và hình 2.

Bảng 4. Giá trị S/N của mẫu huyết thanh lợn sau gây nhiễm bởi 3 chủng PCV2 đông khô

Chủng virus	Lợn thí nghiệm	Ngày sau gây nhiễm					
		Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 21	Ngày 28	Ngày 35
03	1	0,78	0,65	0,32	0,27	0,26	0,16
	2	0,82	0,70	0,28	0,31	0,22	0,18
	3	0,79	0,66	0,30	0,29	0,24	0,17
	TB $\pm$ SD	0,80 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,04	0,30 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,01
04	4	0,78	0,64	0,31	0,30	0,23	0,17
	5	0,97	0,78	0,29	0,19	0,23	0,19
	6	0,88	0,71	0,27	0,22	0,26	0,18
	TB $\pm$ SD	0,88 $\pm$ 0,09	0,71 $\pm$ 0,10	0,29 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,07	0,24 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,01
07	7	0,93	0,79	0,18	0,19	0,34	0,19
	8	0,82	0,64	0,31	0,21	0,22	0,18
	9	0,85	0,70	0,28	0,24	0,25	0,18
	TB $\pm$ SD	0,87 $\pm$ 0,06	0,71 $\pm$ 0,11	0,25 $\pm$ 0,09	0,21 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,08	0,18 $\pm$ 0,01
Đối chứng	10	0,81	0,86	0,83	0,97	0,94	0,92
	11	0,96	0,94	0,96	0,84	1,00	0,96
	TB $\pm$ SD	0,88 $\pm$ 0,11	0,90 $\pm$ 0,06	0,90 $\pm$ 0,10	0,91 $\pm$ 0,09	0,97 $\pm$ 0,04	0,94 $\pm$ 0,03

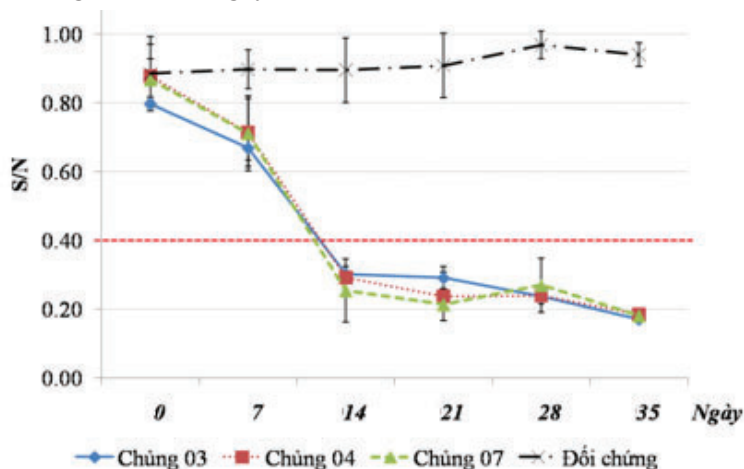
Ghi chú: giá trị trung bình (TB) $\pm$ độ lệch chuẩn (SD)

Giá trị S/N của mẫu huyết thanh tại thời điểm ngày 0 và ngày 7 dao động trong khoảng 0,64 đến 0,97 và lớn hơn giá trị ngưỡng âm tính (S/N > 0,4). Như vậy, toàn bộ lợn thí nghiệm chưa có

hiện tượng chuyển dương tính huyết thanh học tại ngày 7 sau gây nhiễm. Kể từ ngày 14 đến ngày 35, 9/9 lợn thí nghiệm có giá trị S/N dao động trong khoảng 0,16 đến 0,34 (nhỏ hơn giá

trị ngưỡng dương tính $S/N \leq 0,4$) và được đánh giá là dương tính với kháng thể kháng PCV2. Biến động hiệu giá kháng thể của lợn gây nhiễm

bởi 3 chủng PCV2 đông khô được biểu diễn ở hình 2.



Hình 2. Biến động hiệu giá kháng thể của lợn gây nhiễm bởi 3 chủng PCV2 đông khô

Kết quả ở hình 2 cho biết, lợn đối chứng âm ở tất cả các thời điểm đều không có hiện tượng chuyển dương tính huyết thanh học. So sánh với giá trị ngưỡng (đường nét đứt màu đỏ, hình 2) chúng tôi thấy ở nhóm lợn gây nhiễm bằng các chủng PCV2 đông khô đều dương tính ở ngày thứ 14, cao nhất ở thời điểm 35 ngày sau gây nhiễm. Như vậy, cả 3 chủng PCV2 đông khô đều có khả năng kích thích bản động vật sản sinh đáp ứng miễn dịch đặc hiệu.

IV. KẾT LUẬN

- Sau khi đông khô, 3 chủng PCV2 được lựa chọn làm giống sản xuất vaccin có hiệu giá dao động từ $10^{4.5}$ TCID₅₀/0,1 ml đến $10^{5.25}$ TCID₅₀/0,1 ml. So với hiệu giá virus trước đông khô, chúng tôi nhận thấy có sự giảm nhẹ về hiệu giá virus; tuy nhiên hiệu giá virus vẫn đảm bảo đủ điều kiện làm giống để sản xuất vaccin.

- Kết quả thử trên lợn cho thấy rằng cả 3 chủng PCV2 đông khô đều có khả năng kích thích bản động vật sản sinh đáp ứng miễn dịch đặc hiệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 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, tập 13 (3), 406-415.

2. Li, J., T. Yu, X. Wang, J. Zhou, R. Gao, F. Zhang, X. Gao, S. Gao and X. Liu, 2015: Comparative efficacy of experimental inactivated and live-attenuated chimeric porcine circovirus (PCV) 1-2b vaccines derived from PCV1 and PCV2b isolates originated in China. *Virology*, 12, 113.
3. Yang, J. S., D. S. Song, S. Y. Kim, K. S. Lyoo and B. 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.
4. Segales, J., M. Domingo, F. Chianini, N. Majo, J. Dominguez, L. Darwich and E. Mateu, 2004: Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Veterinary microbiology*, 98, 151-158.
5. Patterson, A. R., S. Ramamoorthy, D. M. Madson, X. J. Meng, P. G. Halbur and T. Opriessnig, 2011: Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after experimental infection. *Vet Microbiol*, 149, 91-98.

Nhận ngày 13-4-2016

Phản biện ngày 29-4-2016