

Nâng cao - tham khảo

VIRUS DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI CHỦNG GEORGIA MANG CÁC GEN XÓA MGF360 VÀ MGF505 BỊ GIẢM ĐỘC LỰC TRÊN LỢN VÀ BẢO VỆ VẬT CHỦ KHỎI TÁC ĐỘNG CỦA VIRUS ĐỘC LỰC CAO BAN ĐẦU

Vivian O'Donnell^{1,2}, Lauren G. Holinka¹, Douglas P. Gladue^{1,2}, Brenton Sanford¹, Peter W. Krug¹, Xiqiang Lu³, Jonathan Arzt¹, Bo Reese⁴, Consuelo Carrillo⁵, Guillermo R. Risatti², Manuel V. Borca¹

TÓM TẮT

Virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi (ASFV) là tác nhân gây bệnh truyền nhiễm và thường gây chết lợn nuôi, gây hậu quả kinh tế đáng kể cho ngành chăn nuôi lợn. Việc kiểm soát bệnh dịch tả lợn châu Phi (ASF) đã bị cản trở do không có vaccin. Các vaccin thử nghiệm đã được phát triển bằng cách sử dụng ASFV sống giảm độc lực do được biến đổi gen bằng cách loại bỏ các gen liên quan đến độc lực của virus. Họ đa gen 360 (MGF360) và MGF505 đại diện cho một nhóm gen, có chung một phần trình tự và cấu trúc đặc trưng có liên quan đến tính đặc hiệu về phạm vi vật chủ của ASFV, ngăn chặn đáp ứng tự nhiên của vật chủ và độc lực của virus. Ở đây, chúng tôi báo cáo việc tạo dựng một loại virus tái tổ hợp (ASFV-G-ΔMGF) có nguồn gốc từ chủng ASFV Georgia 2007 độc lực cao (ASFV-G) bằng cách xóa 6 gen thuộc họ MGF360 hoặc MGF505: *MGF505-1R*, *MGF360-12L*, *MGF360-13L*, *MGF360-14L*, *MGF505-2R* và *MGF505-3R*. ASFV-G-ΔMGF nhân lên hiệu quả trong môi trường nuôi cấy tế bào đại thực bào sơ cấp của lợn giống như virus ban đầu. Thử nghiệm trên động vật, ASFV-G-ΔMGF bị giảm độc lực hoàn toàn ở lợn, vì lợn được tiêm bắp (i.m) với 10^2 hoặc 10^4 liều hấp thụ 50% hồng cầu (HAD_{50}) vẫn khỏe mạnh, không có dấu hiệu của bệnh. Điều quan trọng là lợn sau khi tiêm được cho tiếp xúc với ASFV-G thì không có biểu hiện của bệnh, mặc dù phần lớn những lợn này có mang virus công cường độc. Đây là báo cáo đầu tiên chỉ ra vai trò của các gen MGF hoạt động như những yếu tố độc lập quy định độc lực của ASFV. Ngoài ra, ASFV-G-ΔMGF là vaccin thử nghiệm đầu tiên được báo cáo là tạo ra sự bảo vệ ở những con lợn được thử thách với ASFV-G có độc lực cao và có liên quan về mặt dịch tễ học.

TẦM QUAN TRỌNG

Vấn đề chính trong kiểm soát ASF là thiếu vaccin. Nhiều nghiên cứu tập trung vào việc tìm hiểu độc lực của ASFV nhằm sản xuất các virus tái tổ hợp biến đổi gen, mặc dù đã giảm độc lực, nhưng vẫn có khả năng bảo vệ lợn khi được thử thách với virus tương đồng. Ở đây chúng tôi đã tạo ra một ASFV tái tổ hợp giảm độc lực có nguồn gốc từ chủng ASFV Georgia có độc lực cao (ASFV-G) chỉ thiếu sáu trong số các gen của họ đa gen 360 (MGF360) và MGF505 (ASFV-G-ΔMGF). Điều này, lần đầu tiên chỉ ra rằng chỉ cần xóa các gen MGF đặc hiệu có thể làm giảm hoàn toàn độc lực của chủng ASFV có độc lực cao. Virus tái tổ hợp ASFV-G-ΔMGF tạo ra hiệu quả bảo vệ ở lợn trước thách thức với ASFV-G khi lợn được tiêm một lần qua đường tiêm bắp (i.m). Việc bảo vệ chống lại ASFV-G có hiệu quả cao sau 28 ngày kể từ ngày tiêm. Đây là báo cáo đầu tiên về vaccin thử nghiệm tạo ra sự bảo vệ vững chắc chống lại độc lực của ASFV-G.

¹. Agricultural Research Service, USDA, Plum Island Animal Disease Center, Greenport, New York, USA

². Department of Pathobiology and Veterinary Science, CAHNR, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA

³. DHS, Plum Island Animal Disease Center, Greenport, New York, USA

⁴. Center for Genome Innovation, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA

⁵. APHIS, USDA, Plum Island Animal Disease Center, Greenport, New York, USA

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dịch tả lợn châu Phi (ASF) là bệnh virus truyền nhiễm ở lợn gây ra do virus ASF (ASFV), một loài virus lớn có vỏ, chứa 2 sợi ADN có kích thước khoảng 180 đến 190 kbp (1). ASF gây ra một loạt các biểu hiện bệnh, từ gây tử vong cao đến cận lâm sàng, tùy thuộc vào đặc điểm vật chủ và chủng virus (2). Lợn nuôi bị chết do nhiễm ASFV độc lực cao có biểu hiện đặc trưng là sốt, xuất huyết, mất kiểm soát và suy nhược nghiêm trọng.

Hiện nay, ASF là bệnh đặc hữu ở một số quốc gia châu Phi cận Sahara. Ở châu Âu, căn bệnh này lưu hành ở Sardinia (Ý), và các đợt bùng phát dịch bệnh đã được ghi nhận ở vùng Caucasus từ năm 2007, ảnh hưởng đến Gruzia, Armenia, Azerbaijan và Nga, và gần đây là ở Ukraine, Belarus, Lithuania, Latvia, và Ba Lan, đe dọa lây lan cả sang các nước láng giềng ở Tây Âu (3).

Chưa có vaccin cho ASF, các ổ dịch hiện đang được dập tắt bằng các phương pháp kiểm dịch và loại bỏ động vật nhiễm bệnh. Các thử nghiệm vaccin dựa trên việc sử dụng các loại virus bất hoạt khác nhau đã không thành công trong việc tạo ra miễn dịch bảo vệ (4–6). Khả năng miễn dịch bảo vệ chống lại sự tái nhiễm với các virus tương đồng và (hiếm khi) chống lại sự tái nhiễm với các virus khác loại phát triển ở những con lợn sống sót sau khi nhiễm virus (7, 8). Lợn đã miễn dịch với ASFV sống giảm độc lực có chứa các cá thể đã được thiết kế di truyền loại bỏ các gen liên quan đến độc lực của ASFV (gen *UK*, *DP69R*, *23-NL*, *TK* và *9GL*) được bảo vệ khi thử thách với virus có độc lực tương đồng với virus ban đầu (9–12). Cho đến nay, những nghiên cứu đó đã cung cấp bằng chứng thực nghiệm duy nhất mô tả sự phát triển hợp lý của một loại virus sống giảm độc lực có hiệu quả chống lại ASFV.

Bộ gen ASFV chứa các gen cấu tạo nên một số họ đa gen riêng biệt (MGF), ban đầu được đặc trưng là các gen hiện diện dưới dạng trình tự lặp lại trong các vùng gen cuối và được đặt tên để phản ánh độ dài trung bình của sản phẩm gen dự đoán. (13, 14). Hai trong số các họ này, MGF360 và MGF505, nằm trong vùng gen biến đổi cao ở điểm cuối bên trái và các sản phẩm mã hóa có chung những điểm tương đồng về cấu trúc (13–18).

Một số chủng ASFV được nuôi thích nghi trên

môi trường tế bào (chẳng hạn như chủng Badajoz71 hoặc Georgia07 được nuôi thích nghi với tế bào Vero) có chứa các khoảng trống trong vùng gen biến đổi ở điểm cuối bên trái có mang đoạn gen bị xóa bao gồm một số gen khác nhau của cả MGF360 và MGF505 (15, 19–22). Thông thường, sự thích nghi dễ dàng lên trong các dòng tế bào này xảy ra đồng thời với sự suy giảm của các chủng này ở lợn (8, 22–25). Tuy nhiên, không có bằng chứng thuyết phục nào ủng hộ ý tưởng về cơ chế hoạt động nhân - quả giữa việc xóa bỏ các gen MGF đặc hiệu, sự thích nghi với nuôi cấy tế bào và sự suy giảm virus ở lợn.

Nghiên cứu các vùng MGF360 và MGF505 có thể làm sáng tỏ vai trò của chúng trong chu trình sao chép ASFV và/hoặc những tác động của chúng đối với độc lực. Ví dụ, việc xóa các gen MGF ở chủng ASFV BA71 thích nghi với tế bào Vero đã làm giảm khả năng sao chép của virus trong các đại thực bào ở lợn (26, 27), và phục hồi một phần khoảng trống trong bộ gen, nằm trong vùng biến đổi ở điểm cuối bên trái, dẫn đến việc virus lấy lại khả năng sao chép trong các đại thực bào ở lợn (26). Ngoài ra, người ta đã ghi nhận rằng các gen trong vùng MGF360 và MGF505 rất quan trọng đối với khả năng nhân lên của virus trong tế bào ve (28). Cũng đã có những báo cáo rằng các gen MGF360 và MGF505 có liên quan đến sự ức chế sản sinh interferon (IFN) (29). Các gen MGF360 và MGF505 cũng liên quan đến độc lực của virus; sự xóa các gen trong các MGF này đã góp phần làm suy giảm độc lực của chủng Malawi Lil-20 / 1ΔNL tái tổ hợp (30), chủng virus có gen liên quan đến độc lực NL đã bị xóa (31).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi báo cáo kết quả nghiên cứu tạo chủng virus tái tổ hợp có nguồn gốc từ chủng độc lực cao ASFV Georgia 2007 (ASFV-G) bằng cách xóa đặc hiệu 6 gen của các họ đa gen ASFV MGF360 và MGF505 (ASFV-G-ΔMGF). Kết quả cho thấy ASFV-G-ΔMGF nhân lên trong tế bào nuôi cấy đại thực bào sơ cấp ở lợn hiệu quả tương tự như ASFV-G. Trên động vật thí nghiệm, ASFV-G-ΔMGF được tiêm bắp cho lợn với liều cao tới 10^4HAD_{50} thì suy yếu hoàn toàn. Quan trọng là lợn đã gây nhiễm bằng tiêm bắp liều ASFV-G-ΔMGF 10^2 hoặc 10^4HAD_{50} được bảo vệ không có dấu hiệu lâm sàng khi công cường độ bằng chủng virus độc lực cao ban đầu ASFV-G ở 28 ngày sau gây

nhễm (dpi). Đây là báo cáo đầu tiên chỉ ra rằng xóa đặc hiệu các gen thuộc họ đa gen MGF360 và MGF505 là đủ để gây ra sự suy giảm hoàn toàn độc lực của virus phân lập từ thực địa và vì thế virus đã tái tổ hợp gen cũng có khả năng gây đáp ứng miễn dịch hiệu quả khi công cường độc bằng chủng virus độc lực cao ban đầu, ASFV-G.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nuôi cấy tế bào và virus

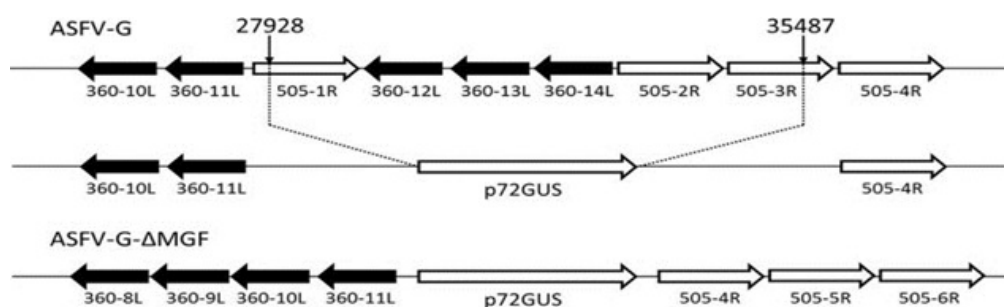
Tế bào đại thực bào lợn sơ cấp được chuẩn bị từ máu lợn đã loại bỏ tơ huyết bằng cách đã được Zsak *et al.* (11) mô tả trước đây. Một cách ngắn gọn, máu lợn được chống đông bằng heparin được ủ ấm ở 37°C trong 1h để làm lắng hồng cầu. Các bạch cầu đơn nhân được phân tách bằng cách tuyền nổi trên gradient mật độ Ficoll-Paque (Pharmacia, Piscataway, NJ) (trọng lượng riêng 1,079). Phần tế bào đơn bào/đại thực bào được nuôi cấy trong các bình nuôi cấy mô Primaria bằng nhựa (Falcon; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ), có chứa môi trường đại thực bào, bao gồm môi trường RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) với 30% chất tạo nổi L929 và 20% huyết thanh nhau thai bò bất hoạt bằng nhiệt (HI-FBS; Thermo Scientific, Waltham, MA), trong 48 giờ ở 37°C với 5% CO₂. Các tế bào kết dính được tách ra khỏi chai nhựa bằng cách sử dụng dung dịch muối đệm phosphat (PBS) 10 mM EDTA và sau đó được gắn vào đĩa Primaria T25 6 hoặc 96 giếng ở mật độ 5×10⁶ tế bào/ml để

sử dụng trong các thử nghiệm trong 24 giờ sau đó. ASFV Georgia (ASFV-G) là chủng phân lập từ thực địa được cung cấp bởi N. Vepkhvadze thuộc Phòng thí nghiệm của Bộ Nông nghiệp (LMA) ở Tbilisi, Cộng hòa Georgia (22).

So sánh sự tăng trưởng của virus ASFV-G và ASFV-G-ΔMGF đã được thực hiện trong nuôi cấy tế bào đại thực bào lợn sơ cấp. Đĩa nhựa 24 giếng đã được phủ một lớp tế bào đã chuẩn bị trước đó và được gây nhiễm ở mức độ đa nhiễm (MOI) là 0,1 hoặc 0,01 (dựa trên HAD₅₀ đã được xác định trước đó trong nuôi cấy tế bào đại thực bào lợn sơ cấp). Sau 1 giờ hấp phụ ở 37°C với 5% CO₂, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và các tế bào được rửa hai lần bằng PBS. Sau đó, các đơn lớp được rửa bằng môi trường đại thực bào và ủ trong 2, 24, 48, 72 và 96 giờ ở 37°C với 5% CO₂. Vào những thời điểm thích hợp sau khi gây nhiễm, các tế bào được đông lạnh ở -70°C hoặc thấp hơn và các dịch tan rã đông được sử dụng để xác định hiệu giá bằng HAD₅₀/ml trong nuôi cấy tế bào đại thực bào lợn sơ cấp. Tất cả các mẫu được chạy đồng thời để tránh sự thay đổi giữa các lần.

Chuẩn độ virus được thực hiện trên nuôi cấy tế bào đại thực bào lợn sơ cấp trong các đĩa 96 giếng. Pha loãng và nuôi cấy virus được thực hiện sử dụng môi trường đại thực bào. Sự hiện diện của virus được đánh giá bằng hấp thụ hồng cầu (HA), và hiệu giá virus được tính bằng phương pháp Reed và Muench (32).

2.2. Tạo chủng ASFV-G-ΔMGF tái tổ hợp



Hình 1. Sơ đồ thể hiện vùng gen MGF360 và MGF505 bị xóa trong ASFV-G-ΔMGF và được thay thế bằng dài gen chỉ thị p72GUS. Các vị trí nucleotide nằm ở ranh giới của đoạn bị xóa trên bộ gen ASFV-G được biểu hiện/đánh dấu.

Các ASFV tái tổ hợp được tạo ra bằng cách tái tổ hợp tương đồng giữa bộ gen ASFV của bố mẹ và vector chuyển tái tổ hợp sau lây nhiễm và chuyển nhiễm trong nuôi cấy tế bào đại thực bào lợn (11, 33).

Vector chuyển tái tổ hợp (p72GUSΔMGF) chứa các vùng gen đệm, bao gồm amino acid kết thúc của gen MGF505-1R nằm ở bên trái (nhánh trái nằm giữa các vị trí gen 24566 và 27928) và carboxyl kết thúc

của gen *MGF505-3R* nằm bên phải (nhánh phải nằm giữa các vị trí gen 35.487 và 36.515) và một dải gen chỉ thị chứa gen β -glucuronidase (β -GUS) gen khởi động muợn ASFV p72 (11). Cấu trúc này tạo ra sự mất đoạn 7.558 nucleotide trong vùng biến đổi bên trái của ASFV-G (giữa các vị trí nucleotide 27.928 và 35.487) (hình 1). Vector chuyển tái tổ hợp p72GUS Δ MGF được tạo ra bằng cách tổng hợp DNA (Epoch Life Sciences, Sugar Land, TX, USA). Tế bào đại thực bào nuôi cấy bị gây nhiễm ASFV-G và được chuyển bằng p72GUS Δ MGF. Các virus tái tổ hợp bám trên bề mặt đĩa sơ cấp đã được tinh sạch để đồng nhất bằng các lần tinh sạch liên tiếp các đĩa thử nghiệm thuần khiết.

2.3. PCR

ASFV-G- Δ MGF thuần khiết trong môi trường bảo quản virus đã được sử dụng cho PCR. Trình tự cặp mồi sử dụng trong PCR phát hiện các gen MGF350/MGF505 như sau: mồi xuôi: 5'-GAGGATGATTGCCCTTCACTCA-3', mồi ngược: 5'-CGCCAC-TAGTAAACATTGTTCTATCT-3'. Cặp mồi này khuếch đại đoạn gen có kích thước 422bp thuộc khung đọc mở (ORF) gen *MGF505-1R*. Trình tự cặp mồi sử dụng cho PCR xác định gen β -GUS như sau: mồi xuôi: 5'-GACGGCCTGTGGGCATT-3', mồi ngược: 5'-GCGATGGATTCCGGCAT-3'. Trình tự cặp mồi sử dụng cho PCR xác định gen p72 (B646L) như sau: mồi xuôi: 5'-GTCTTATTGCTAAC-GATGGGAAG3', mồi ngược: 5'-CCAAAGGTAA-GCTTGTTTCCCAA-3'.

2.4. Giải trình tự các sản phẩm PCR

Các sản phẩm PCR được giải trình tự bằng phương pháp kết thúc chuỗi sử dụng dideoxynucleotide dideoxynucleotide chain termination (34). BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) đã được sử dụng trong phản ứng giải trình tự gen. Sản phẩm phản ứng được giải trình tự trên máy giải trình tự ADN tự động Prism 3730xl (Applied Biosystems). Dữ liệu trình tự được tập hợp bằng chương trình phần mềm Phrap (<http://www.phrap.org>), xác nhận các tập hợp được thực hiện sử dụng CAP3 (35). Trình tự đồng thuận ADN cuối cùng thể hiện các nucleotide được lặp lại ít nhất 5 lần. So sánh trình tự được thực hiện bằng phần mềm BioEdit (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA) (35).

2.5. Giải trình tự thế hệ mới (NGS) bộ gen ASFV

ADN của ASFV được chiết tách từ những tế bào bị nhiễm virus và được định lượng như mô tả trước đây (22). Giải trình tự toàn bộ gen của virus đã được thực hiện theo những mô tả trước đó (22). Mô tả ngắn gọn như sau: 1 μ g ADN của virus được cắt bằng enzyme thành nhiều mảnh ADN có kích thước đã được ước định. Bộ điều hợp và lưu trữ mã vạch đã được liên kết với ADN bị phân mảnh. Kích thước thu được trong bộ điều hợp được thu thập bằng cách sử dụng hệ thống Pippin Prep (Sage Science), sau đó được chuẩn hóa nồng độ. ADN thu được sau đó được khuếch đại vô tính lên các hạt Ion hình cầu (ISPs) và được làm giàu. Các mẫu ISP đã làm giàu được chuẩn bị và tải lên các chip Ion để giải trình tự. Phân tích trình tự được thực hiện bằng Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) và CLC Genomics Workbench (CLCBio).

2.6. Thử nghiệm trên động vật

Các thí nghiệm trên động vật được thực hiện trong điều kiện an toàn sinh học cấp độ 3 trong các cơ sở động vật tại Trung tâm Bệnh động vật Plum Island (PIADC) theo một quy trình đã được Ủy ban Chăm sóc và sử dụng động vật phê duyệt.

Kiểu hình độc lực của ASFV-G- Δ MGF được đánh giá tương quan với kiểu hình độc lực của ASFV-G, virus bố mẹ của nó, trên lợn giống thương mại nặng 80 đến 90 pound. Năm con lợn được tiêm bắp (i.m) với 10^2 hoặc 10^4 HAD₅₀ ASFV-G- Δ MGF hoặc ASFV-G. Các dấu hiệu lâm sàng (chán ăn, trầm cảm, sốt, da tím nhợt, dáng đi loạng choạng, tiêu chảy và ho) và sự thay đổi nhiệt độ cơ thể được ghi lại hàng ngày trong suốt thí nghiệm.

Để đánh giá hiệu quả bảo vệ của ASFV-G- Δ MGF, ở 28 ngày sau khi gây nhiễm, các con lợn bị nhiễm ASFV-G- Δ MGF được công cường độc bằng cách tiêm bắp ASFV-G với liều 10^3 HAD₅₀. Các dấu hiệu lâm sàng (như mô tả ở trên) và sự thay đổi nhiệt độ cơ thể được ghi lại hàng ngày trong suốt thí nghiệm.

2.7. Phát hiện kháng thể kháng ASFV

Các kháng thể kháng ASFV trong huyết thanh của động vật bị nhiễm bệnh đã được định lượng theo quy trình nội bộ của phòng thí nghiệm. Tế bào Vero đã được gây nhiễm (MOI = 0,1) ASFV chủng Georgia thích nghi trên tế bào Vero (22) trong đĩa 96 giếng. Các

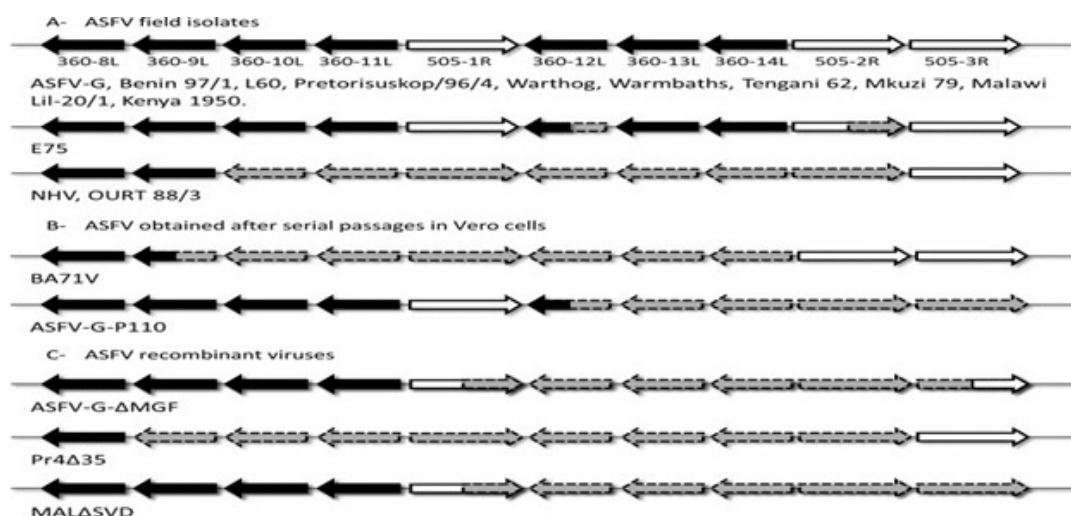
dung dịch huyết thanh pha loãng bậc hai được ủ trong 1 giờ ở 37°C trong đĩa 96 giếng đã được phủ một lớp tế bào nhiễm ASFV. Sau khi rửa, sự hiện diện của kháng thể kháng ASFV được phát hiện bằng cách sử dụng globulin miễn dịch chuột kháng lợn gắn peroxidase thương mại và chất nền peroxidase (Phòng thí nghiệm Vector, Burlingame, CA). Chuẩn độ được biểu thị bằng $\log_{10}$ nghịch đảo của độ pha loãng huyết thanh cao nhất cho thấy có phản ứng với các tế bào bị nhiễm.

III. KẾT QUẢ

Tương đồng amino acid của các protein giả định được mã hóa bởi ORFs MGF360-12L, -13L và -14L và MGF505-1R, -2R và -3R. Các protein giả định được mã hóa bởi ORF MGF360-12L, -13L và -14L và MGF505-1R, -2R và -3R của ASFV-G được so sánh giữa các chủng ASFV có nguồn gốc địa lý và thời gian khác nhau (bảng 1 và hình 2).

Bảng 1. Tương đồng amino acid của các protein giả định được mã hóa bởi ORFs MGF360-12L, -13L và -14L và MGF505-1R, -2R và -3R của các chủng ASFV so với ASFV-G

Chủng	Mã GenBank	Nguồn gốc địa lý	Vật chủ	Năm phân lập	Độc lực	MGF360 ORF identity			MGF505 ORF identity		
						12L	13L	14L	1R	2R	3R
Tengani 62	AY261364	Malawi	Lợn	1962	Cao	0,994	0,951	0,966	0,979	0,952	0,964
Mkuzi	AY261362	Nam Phi	Ve	1979	Không xác định	0,957	0,960	0,988	0,915	0,988	0,935
Warmbaths	AY261365	Nam Phi	Ve	1987	xác định	0,962	0,929	0,932	0,907	0,948	0,953
Benin 97/1	AM712239	Benin	Lợn	1997	Cao	0,928	0,957	0,988	0,902	0,990	0,925
E75	FN557520	Tây Ban Nha	Lợn	1975	Cao	0,940 ^a	0,957	0,988	0,902	0,990 ^b	0,925
L60	KM262844	Bồ Đào Nha	Lợn	1960	Cao	0,934	0,957	0,988	0,902	0,990	0,925
Warthog	AY261366	Namibia	Warthog	1980	Không xác định	0,962	0,937	0,966	0,896	0,933	0,964
Pretoriuskop/96/4	AY261363	Nam Phi	Ve	1996	Cao	0,965	0,923	0,960	0,883	0,944	0,957
Malawi Lil-20/1	AY261361	Malawi	Ve	1983	Cao	0,894	0,870	0,896	0,892	0,899	0,864
Kenya 1950	AY261360	Kenya	Lợn	1950	Cao	0,866	0,841	0,899	0,862	0,861	0,834



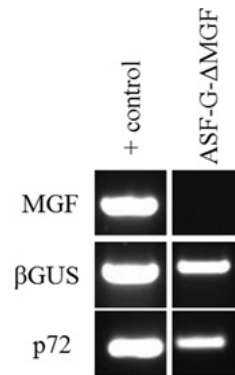
Hình 2. Sơ đồ biểu hiện vùng gen MGF360 và MGF505 bị xóa của ASFV-G-ΔMGF so với virus tự nhiên (A), virus được chuyển sang tế bào (B), và virus tái tổ hợp (C). Mũi tên màu ghi và đứt đoạn đại diện một phần và toàn bộ gen bị xóa.

Bất chấp những khác biệt, mức độ bảo tồn cao đã được quan sát thấy giữa các ORF này. Mức độ tương đồng từ 84% trở lên được quan sát thấy trong số các ORF này, với mức độ tương đồng thấp nhất được quan sát thấy với chủng của Kenya phân lập được vào năm 1950. Các chủng thực địa này được coi là chủng độc lực đối với lợn nhà, ngoại trừ các chủng thực địa Mkuzi, Warmbaths và Warthog, khả năng gây bệnh của những chủng này chưa được biết. Ngược lại, so sánh vùng gen biến đổi bên trái của chủng không độc lực ASFV phân lập từ thực địa OURT88/3 và NHV với vùng gen này của ASFV-G đã cho thấy đoạn bị xóa bao gồm các thành viên khác nhau của MGF360 và MGF505 ORF, bao gồm MGF360-12L, -13L, và -14L và MGF505 -1R, -2R và -3R, như vậy các họ gen này có thể đóng vai trò trong khả năng gây bệnh của ASFV.

3.1. Sự phát triển của ASFV-G-ΔMGF đột biến xóa

ASFV-G-ΔMGF được tạo dựng từ chủng ASFV Georgia 2007 có khả năng gây bệnh cao (ASFV-G). Vùng gen 7.558 bp (giữa các vị trí nucleotide 27928 và 35487) đã bị xóa khỏi virus ASFV-G và được thay thế bằng một dải chứa gen chỉ thị *p72GUS* bằng cách tái tổ hợp tương đồng (xem phần Vật liệu và phương pháp). Kết quả là virus tái tổ hợp có đoạn gen bị xóa bao gồm một nửa của gen MGF505-1R ở đầu carboxyl và xóa bỏ hoàn toàn các gen MGF360-12L, -13L và -14L và gen MGF505-2R cùng với sự xóa bỏ một nửa gen MGF505-3R ở đầu amin (hình 1). Virus tái tổ hợp thu được sau tám lần thanh lọc màng bám liên tiếp trên các đơn lớp tế bào nuôi cấy đại thực bào lợn sơ cấp. Toàn bộ virus thu được từ vòng tinh sạch màng bám cuối cùng được khuếch đại trong tế bào nuôi cấy đại thực bào lợn sơ cấp để thu được nguồn dự trữ virus.

Để chắc chắn không có mặt ASFV-G bố mẹ, ADN của virus đã được chiết tách từ virus dự trữ và phân tích bằng PCR sử dụng các đoạn mồi nhắm vào các gen *p72* (B646L), *MGF* và *β-GUS*. Chỉ amplicon (một đoạn ADN hoặc ARN) cho gen *p72* (B646L) và *β-GUS* được phát hiện trong ADN chiết tách từ virus dự trữ; không có amplicon nào được tạo ra với các đoạn mồi nhắm vào gen MGF505-1R (hình 3), cho thấy không có sự ô nhiễm của ASFV-G trong ASFV-G-ΔMGF dự trữ.



Hình 3. Phân tích PCR các ASFV-G-ΔMGF dự trữ bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu với các gen MGF360, MGF505, *p72* (B646L) hoặc *β-GUS*. + control: ADN của ASFV-G để phát hiện gen MGF360, MGF505, *p72* và plasmid tái tổ hợp *p72GUSΔMGF* để phát hiện gen *β-GUS*.

3.2. Phân tích tương quan giữa trình tự bộ gen ASFV-G-ΔMGF với trình tự bộ gen ASFV-G

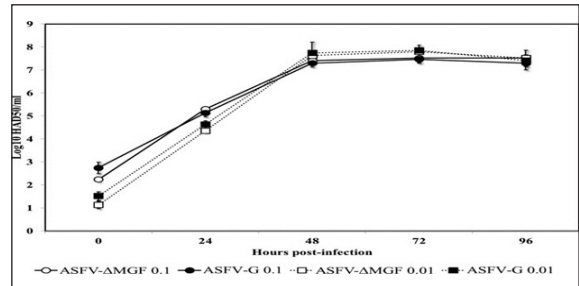
Để đánh giá độ chính xác của việc chỉnh sửa gen và tính toàn vẹn của bộ gen của virus tái tổ hợp, trình tự bộ gen đầy đủ của ASFV-G-ΔMGF và các chủng ASFV-G được giải trình tự bằng cách sử dụng NGS và Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) và so sánh. So sánh bộ gen có độ dài đầy đủ giữa ASFV-G bố mẹ và ASFV Georgia 2007/1 (Mã GenBank FR682468) (3) đã thu được các kết quả sau: sự hiện diện của hai nucleotide chèn vào (một nucleotide T và một nucleotide A ở vị trí nucleotide 430 và 441, lần lượt) trong một đoạn không mã hóa ở đầu 5' của bộ gen virus; đột biến lệch khung kép (mất đoạn TT và chèn T ở vị trí nucleotide 1.602 và 1.620, tương ứng) ảnh hưởng đến gen MGF360-1L; một đột biến lặn (ở vị trí nucleotide 97.321) trong ORF B438L; thay thế Ala thành Pro ở vị trí 85 trong ORF E199L; và chèn một nucleotide (ở vị trí nucleotide 183.303) trong một đoạn không mã hóa ở đầu 3' của bộ gen (22). So sánh bộ gen đầy đủ giữa ASFV-G-ΔMGF và ASFV-G cha mẹ cho thấy sự mất đoạn nucleotide (7.558 bp) tương ứng với sự thay đổi được trình bày ở trên. Ngoài ra, trình tự đồng thuận của bộ gen ASFV-G-ΔMGF cho thấy có sự chèn 2.324 nucleotide tương ứng với trình tự dài *p72GUS*. Bên cạnh việc chèn dài *p72GUS*, không

có thêm sự khác biệt nào được quan sát thấy giữa bộ gen ASFV-G-ΔMGF và ASFV-G, như vậy có thể khẳng định rằng virus ASFV-G-ΔMGF không xảy ra đột biến ngoài dự kiến trong quá trình tái tổ hợp tương đồng và thanh lọc mảng bám/tế bào.

3.3. Sự nhân lên của ASFV-G-ΔMGF trong đại thực bào lợn sơ cấp

Các gen MGF nằm trong vùng biến đổi bên trái trong bộ gen ASFV đã được mô tả là có liên quan đến quá trình sao chép của ASFV ở đại thực bào lợn (22, 26, 27). Các đặc điểm tăng trưởng *in vitro* của ASFV-G-ΔMGF được đánh giá trong quá trình nuôi cấy tế bào đại thực bào lợn sơ cấp, tế bào sơ cấp được ASFV nhắm tới trong quá trình lây nhiễm ở lợn và được so sánh với các đặc điểm của giống ASFV-G bố mẹ trong phân tích đường cong tăng trưởng nhiều bước. Nuôi cấy tế bào bị nhiễm các virus này ở MOI là 0,1 hoặc 0,01; và các mẫu được thu thập ở 2, 24, 48, 72 và 96 giờ sau gây nhiễm (hpi). ASFV-G-ΔMGF hiển thị động năng phát triển tương tự như động năng của virus ASFV-G cha mẹ (hình 4). Do đó, việc xóa các gen *MGF360* và

MGF505 trong ASFV-G-ΔMGF không ảnh hưởng đáng kể đến khả năng nhân lên của virus trong các mẫu nuôi cấy đại thực bào lợn sơ cấp.



Hình 4. Sự tăng trưởng động năng trong ống nghiệm của ASFV-G-ΔMGF và ASFV-G bố mẹ. Nuôi cấy tế bào đại thực bào lợn sơ cấp đã bị nhiễm (MOI = 0,1 hoặc 0,01) virus ASFV-G-ΔMGF hoặc ASFV-G cha mẹ, và hàm lượng virus được chuẩn độ trong nuôi cấy tế bào đại thực bào lợn sơ cấp thu được vào thời điểm xác định sau khi gây nhiễm. Dữ liệu thể hiện giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của các kết quả từ hai thí nghiệm độc lập. Độ nhạy phát hiện virus, $\geq \log_{10} 1,8 \text{ HAD}_{50}/\text{ml}$.

Bảng 2. Khả năng sống sót và phản ứng sốt sau khi gây nhiễm cho lợn qua đường tiêm bắp với các liều ASFV-G-ΔMGF và ASFV-G khác nhau

Liều lượng (HAD ₅₀) và chủng virus	Số sống/tổng số (con)	Thời gian chết trung bình (ngày ± SD)	Dữ liệu về sốt		
			Ngày sốt sau tiêm (ngày ± SD)	Khoảng thời gian sốt (số ngày ± SD)	Nhiệt độ tối đa trong ngày (°F ± SD)
10 ²					
ASFV-G	0/5	9,2 (0,45)	7,2 (0,84)	2 (0,71)	106,4 (0,67)
ASFV-G-ΔMGF	10/10	— ^a	—	—	102,2 (0,29)
10 ⁴					
ASFV-G	0/5	7,4 (0,55)	3,6 (0,89)	3,8 (1,1)	106,9 (0,51)
ASFV-G-ΔMGF	10/10	—	—	—	102,7 (0,81)

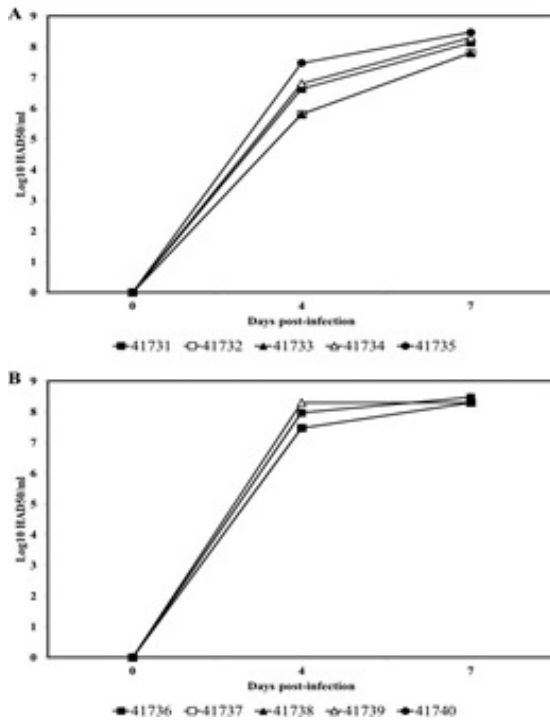
Ghi chú: a: lợn không bị chết hoặc không có biểu hiện sốt trong suốt thời gian theo dõi.

3.4. Đánh giá độc lực của ASFV-G-ΔMGF ở lợn

Để đánh giá ảnh hưởng của việc xóa bỏ các gen *MGF360* và *MGF505* đối với độc lực của ASFV-G-ΔMGF, bốn nhóm lợn từ 80 đến 90 pound đã được tiêm bắp huyền dịch virus ASFV-G-ΔMGF ($n = 10$) hoặc ASFV-G ($n = 5$) với liều 10^2 hoặc 10^4 HAD_{50} . Đúng như dự đoán, lợn bị nhiễm 10^4 HAD_{50} của ASFV-G có biểu hiện tăng nhiệt độ cơ thể ($>$

104°F) từ 3 đến 4 ngày sau khi gây nhiễm, sau đó xuất hiện các dấu hiệu lâm sàng liên quan đến bệnh, bao gồm chán ăn, trầm cảm, da đổi màu tím tái, đi loạng choạng và tiêu chảy (bảng 2). Các dấu hiệu của bệnh tăng dần theo thời gian, và động vật chết hoặc được giết bỏ trong 7 đến 8 ngày sau khi gây nhiễm. Động vật bị nhiễm 10^2 HAD_{50} của ASFV-G cũng mắc bệnh tương tự, với sự khác biệt là thời gian khởi phát các dấu hiệu lâm sàng và thời gian

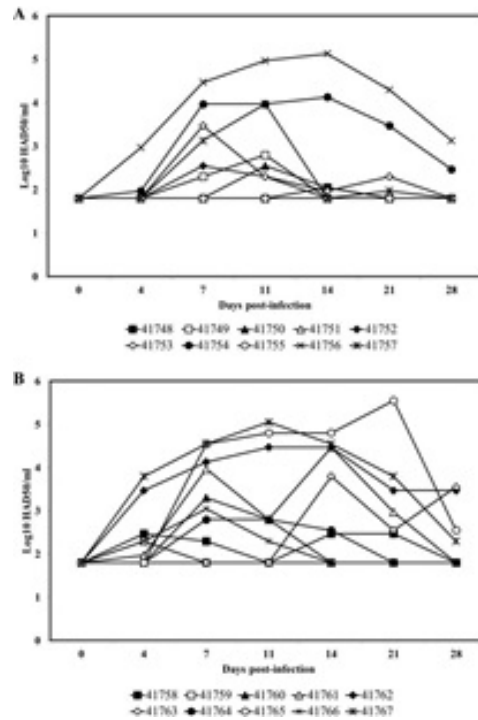
chết chậm hơn từ 3 đến 4 ngày so với những lợn bị nhiễm 10^4 HAD₅₀. Ngược lại, những con lợn được gây nhiễm bằng tiêm bắp với 10^2 hoặc 10^4 HAD₅₀ ASFV-G-ΔMGF không có bất kỳ dấu hiệu lâm



Hình 5. Hàm lượng virus trong các mẫu máu thu được từ những con lợn được tiêm bắp bằng ASFV-G liều 10^2 (A) hoặc 10^4 (B) HAD₅₀. Giá trị được biểu hiện dạng $\log_{10}$ HAD₅₀/ml. Độ nhạy phát hiện virus là $\geq \log_{10} 1,8$ HAD₅₀/ml.

Hàm lượng virus trong máu lợn thí nghiệm được định lượng ở các ngày khác nhau sau khi gây nhiễm vào môi trường nuôi cấy tế bào đại thực bào lợn. Đúng như dự đoán, những con lợn được tiêm ASFV-G cha mẹ liều 10^2 hoặc 10^4 HAD₅₀ có nồng độ virus trong máu rất cao cho đến ngày chúng chết (hình 5). Trong cả hai nhóm, hiệu giá virus huyết đạt giá trị cao (từ 10^7 đến 10^8 HAD₅₀/ml) ở thời điểm tử vong. Ngược lại, các lợn được tiêm ASFV-G-ΔMGF liều 10^2 hoặc 10^4 HAD₅₀ có hiệu giá virus trong máu tương đối thấp so với các lợn được tiêm ASFV-G. Những con lợn được tiêm ASFV-G-ΔMGF liều 10^2 HAD₅₀ đã cho biểu hiện kiểu hiệu giá virus trong máu không đồng nhất. Ba con lợn thể hiện mức có thể phát hiện (độ nhạy thử nghiệm của chúng tôi là $\geq 10^{1,8}$ HAD₅₀/ml),

sàng nào của bệnh trong suốt thời gian theo dõi (21 ngày). Do đó, xóa bỏ MGF360-12L, -13L và -14L và MGF505-1R, -2R và -3R làm suy giảm hoàn toàn độc lực của ASFV-G.



Hình 6. Hàm lượng virus trong các mẫu máu thu được từ những con lợn được tiêm bắp bằng ASFV-G-ΔMGF liều 10^2 (A) hoặc 10^4 (B) HAD₅₀. Giá trị được biểu hiện dạng $\log_{10}$ HAD₅₀/ml. Độ nhạy phát hiện virus là $\geq \log_{10} 1,8$ HAD₅₀/ml.

sáu con khác có giá trị hiệu giá trung bình (10^2 đến 10^4 HAD₅₀/ml) và chỉ một con có hiệu giá virus huyết đạt 10^5 HAD₅₀/ml (hình 6A). Hầu hết tất cả lợn thí nghiệm đều cho kết quả âm tính ($\leq 10^{1,8}$ HAD₅₀/ml) ở 28 ngày sau công cường độc (28 dpi). Các động vật được tiêm ASFV-G-ΔMGF liều 10^4 HAD₅₀/ml có biểu hiện kiểu nhiễm virus cũng không đồng nhất, mặc dù nhìn chung, chúng có giá trị virus trong máu cao hơn so với những con được tiêm 10^2 HAD₅₀. Trong nhóm này, 4 trong số 10 con lợn có giá trị virus huyết lớn hơn 10^4 HAD₅₀/ml ít nhất tại một số điểm mẫu, trong khi 6 con khác biểu hiện hiệu giá virus huyết cao nhất thỉnh thoảng đạt đến 10^3 đến 10^4 HAD₅₀/ml (hình 6B). Tại thời điểm thử thách, sáu trong số những con lợn này không thể phát hiện được có virus có trong máu,

trong khi bốn con khác trong nhóm có hiệu giá virus trong máu lên đến 10^2 đến 10^3 HAD₅₀/ml. Nhìn chung, các lợn bị nhiễm ASFV-G-ΔMGF có xu hướng biểu hiện nồng độ virus trong máu thấp hơn nhưng biểu hiện nhiễm virus trong máu kéo dài so với các động vật được tiêm ASFV-G bố mẹ.

3.5. Lợn được gây nhiễm virus ASFV-G-ΔMGF được bảo vệ khi công cường độc bằng virus bố mẹ có độc lực cao

Để đánh giá ảnh hưởng của việc tiêm ASFV-G-ΔMGF đối với khả năng bảo vệ lợn tiêm khi công cường độc với virus bố mẹ độc lực cao, những con lợn đã tiêm ASFV-G-ΔMGF đã được công cường độc với ASFV-G bố mẹ. Lợn được chia thành 2 nhóm, một nhóm những con được tiêm bắp với ASFV-G-ΔMGF 10^2 HAD₅₀ và nhóm còn lại là những con được tiêm bắp ASFV-G-ΔMGF 10^4 HAD₅₀, sau 28 ngày tiêm, lợn ở cả hai nhóm được công cường độc bằng ASFV-G cha mẹ liều 10^3 HAD₅₀. Các dấu hiệu

lâm sàng và sự thay đổi nhiệt độ cơ thể của các lợn thí nghiệm được theo dõi hàng ngày.

Năm con lợn khỏe, sạch bệnh đã được tiêm với ASFV-G cha mẹ bằng đường tiêm và liều lượng tương tự để làm nhóm đối chứng. Những con lợn này có các dấu hiệu liên quan đến ASF sau 5 ngày tiêm (day post challenge - dpc), với các dấu hiệu tiến triển thành các biểu hiện bệnh nặng hơn trong những ngày tiếp theo và tất cả các con lợn chết hoặc bị giết chết trong khoảng 8 dpc. Tất cả các lợn được tiêm ASFV-G-ΔMGF liều 10^2 hoặc 10^4 HAD₅₀ đều sống sót sau thử thách với virus bố mẹ độc lực cao. Nhìn chung, tất cả những con lợn này vẫn bình thường về mặt lâm sàng trong suốt thời gian quan sát (21 ngày), ngoại trừ một số con có biểu hiện tăng thân nhiệt vừa phải nhất thời trong vòng một ngày (bảng 3). Như vậy, gây nhiễm bằng ASFV-G-ΔMGF liều 10^2 hoặc 10^4 HAD₅₀ có hiệu quả bảo vệ lợn khi công cường độc bằng virus ASFV-G bố mẹ độc lực cao, lợn không chết và không có biểu hiện lâm sàng của bệnh.

Bảng 3. Khả năng sống của lợn và phản ứng sốt của lợn được tiêm bắp với ASFV-G-ΔMGF liều 10^2 hoặc 10^4 HAD₅₀ và được thử thách sau 28 ngày tiêm bằng cách tiêm bắp ASFV-G^a bố mẹ liều 10^3 HAD₅₀

Thử nghiệm	Số sống/tổng số tiêm (con)	Thời gian chết sau tiêm (số ngày ± SD)	Số liệu về sốt ^b		
			Ngày sốt sau tiêm (số ngày ± SD) t	Thời gian bị sốt (số ngày ± SD)	Thân nhiệt cao nhất trong ngày (°F ± SD)
10^2 HAD ₅₀	10/10	— ^c	7,5 (1,74) ^d	1 (0)	103,5 (1,04)
10^4 HAD ₅₀	10/10	—	7,5 (4,42) ^e	1 (0)	103,7 (1,10)
Chứng âm	0/5	8,2 (1,1)	5,20 (1,31)	3,0 (0,70)	106,5 (0,46)

Ghi chú: a: Số liệu thể hiện giá trị trung vị và độ lệch chuẩn; b: Nhiệt độ trực tràng trên 104°F; c: lợn không chết hoặc chúng không biểu hiện sốt trong suốt thời gian quan sát; d: 3 trong số 10 con lợn biểu hiện sốt: 1 con sốt 105,1°F ở 4 dpi và 2 con sốt 104,2°F và 105,5°F ở 7 dpi; e: 4 trong 10 con lợn có biểu hiện sốt 1 con lợn sốt 105,8°F ở 4 dpi, 2 con lợn sốt 104,8°F và 105,6°F ở 6 dpi và 1 con bị sốt 104,2°F ở 14 dpi.

Biểu hiện hiệu giá virus trong máu lợn thu được khi thử thách là một chỉ số thể hiện hiệu lực bảo vệ của miễn dịch được tạo ra bởi ASFV-G-ΔMGF. Sự hiện diện của virus trong máu sau khi công cường độc được phát hiện (ở các mức độ khác nhau) ở 8/10 con lợn trong cả hai nhóm (dữ liệu không được hiển thị). Loại virus có trong các mẫu máu đó được xác định bằng PCR thông thường, sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu cho gen *β-GUS* và cho gen *MGF-1R* làm chỉ thị cho sự

hiện diện của ASFV-G-ΔMGF và ASFV-G, tương ứng. Thời điểm kiểm tra được chọn dựa trên hiệu giá cao nhất cho mỗi con lợn. Trong số 10 con lợn thuộc nhóm được tiêm ASFV-G-ΔMGF liều 10^2 HAD₅₀, 1 con không có biểu hiện nhiễm virus hoặc PCR dương tính. Một con lợn khác có hiệu giá rất thấp mà không phát hiện được bằng PCR. Trong số 8 con lợn còn lại, 5 con dương tính với ASFV-G-ΔMGF nhưng âm tính với ASFV-G, trong khi 3 con còn lại dương tính với sự hiện diện

của cả hai loại virus (bảng 4). Đối với những con lợn được tiêm ASFV-G-ΔMGF liều 10^4 HAD₅₀, sáu con trong số chúng có ASFV-G-ΔMGF trong mẫu máu nhưng âm tính với ASFV-G, trong khi bốn con còn lại dương tính với cả hai loại virus (bảng 4). Do đó, mặc dù đã đạt được sự bảo vệ hoàn toàn đối với dạng lâm sàng của bệnh, nhưng khoảng 30% đến 40% số lợn được tiêm ASFV-

G-ΔMGF vẫn mang virus bố mẹ. Điều thú vị là hầu hết các lợn có biểu hiện tăng nhiệt độ cơ thể nhẹ đều là những con vật có chứa virus thử thách trong máu của chúng. Hơn nữa, liên quan đến sự hiện diện của virus ASFV-G hoặc sốt nhẹ, tất cả các lợn thí nghiệm đều cho thấy mức độ cao của kháng thể kháng ASFV lưu hành tại thời điểm thử thách.

Bảng 4. Virus huyết, virus được phát hiện trong máu, đáp ứng kháng thể, và sốt ở lợn được nhiễm với ASFV-G-ΔMGF và thử thách với ASFV-G bố mẹ

ASFV-G-ΔMGF HAD ₅₀ / thời gian thử thách cho lợn được chỉ định	Virus huyết (log ₁₀ HAD ₅₀ /ml) ^a	Phát hiện virus trong máu (PCR)		Hàm lượng kháng thể kháng ASFV (log ₁₀) ^b	Sốt ^c
		ASFV-G- ΔMGF	ASFV-G		
10 ² /28 dpi					
41748	2,05	+	+	3,81	Không
41749	2,55	+	+	3,51	Có
41750	4,55	+	+	2,9	Có
41751	≤1,8	+	-	3,68	Không
41752	≤1,8	+	-	3,81	Không
41753	2,97	+	-	3,81	Có
41754	2,47	+	-	3,81	Không
41755	2,47	-	-	3,81	Không
41756	2,47	+	-	3,81	Không
41757	≤1,8	-	-	3,68	Không
10 ⁴ /28 dpi					
41758	2,97	+	+	3,81	Có
41759	6,12	+	+	3,68	Có
41760	≤1,8	+	-	3,68	Không
41761	≤1,8	+	-	3,81	Không
41762	3,47	+	-	3,81	Không
41763	≤1,8	+	-	3,68	Không
41764	5,55	+	+	3,08	Có
41765	3,3	+	-	3,81	Không
41766	3,55	+	-	3,81	Không
41767	4,55	+	+	3,81	Có

Ghi chú: a: Virus huyết đã được kiểm tra ở 4 hoặc 7 dpi; chỉ hàm lượng cao nhất được phát hiện được thể hiện. Độ nhạy phát hiện là $\geq \log_{10} 1,8$ HAD₅₀/ml. b: Hàm lượng kháng thể trong huyết thanh (ở 28 dpi) được biểu hiện dạng log₁₀ của nghịch đảo độ pha loãng cao nhất ở đó cho kết quả dương tính. c: Các lợn có nhiệt độ trực tràng tăng tạm thời ở trên 104°F.

IV. THẢO LUẬN

Gây nhiễm bằng các chủng ASFV sống giảm độc lực là phương pháp duy nhất hiện có để bảo vệ lợn hiệu quả trước sự thách thức với các chủng có độc

lực tương đồng. Các virus giảm độc lực này đã được phát triển bằng cách chuyển đoạn tuần tự trong nuôi cấy tế bào (8, 23–25) hoặc bằng thao tác di truyền. Các virus giảm độc lực thu được bằng thao tác di

truyền liên quan đến việc xóa các gen đặc hiệu bằng quá trình tái tổ hợp tương đồng (9–12, 36). Các virus đột biến tái tổ hợp bằng xóa gen được tạo ra đã bị giảm đáng kể độc lực ở lợn, và trong mọi trường hợp, lợn được gây nhiễm bằng một trong số các loại virus biến đổi gen này đều sống sót sau khi bị nhiễm virus độc lực tương ứng (9–12, 36). Những phát hiện đó cho thấy rằng sự phát triển của virus tái tổ hợp ASFV giảm độc lực bằng các thao tác di truyền của một gen (một số gen) đặc hiệu là một cách tiếp cận hiệu quả để phát triển vaccin.

Các gen *MGF360* và *MGF505* tồn tại trong vùng biến đổi cao ở tận cùng bên trái của bộ gen ASFV và là mối quan tâm của các nghiên cứu kể từ khi một số chủng phân lập trong thực địa bị giảm độc lực tự nhiên như OURT 88/3 hoặc NHV (37), hoặc chủng làm yếu, thích nghi nuôi cấy tế bào như chủng BA71v (15, 19–21) hay ASFV-G/V110 (22), có hiện diện các loại bỏ tương tự trong khu vực này bao gồm các thành viên của cả hai nhóm MGF (hình 2). Chẳng hạn như: ASFV-G/V110 thiếu *MGF360*-13L và -14L cùng với *MGF505*-2R, -3R, -4R và -5R; NHV và OURT 88/3 cùng có các loại xóa giống nhau ảnh hưởng đến *MGF360*-10L, -11L, -12L, -13L và -14L cùng với *MGF505*-1R và -2R; và BA71v có các vùng xóa bao gồm *MGF360*-9L, -10L, -11L, -12L, -13L và 14L cùng với *MGF505*-1R. Mặc dù tất cả các virus giảm độc lực này đều bị xóa ở vùng biến đổi bên trái của bộ gen bao gồm các thành viên *MGF360* và *MGF505*, cho đến nay mối quan hệ nguyên nhân - kết quả trực tiếp giữa giảm độc lực và xóa gen MGF vẫn chưa được chứng minh.

Vai trò của *MGF360* và *MGF505* trong việc xác định phạm vi vật chủ của ASFV đã được nghiên cứu tốt hơn. Ví dụ: người ta đã chứng minh được rằng việc xóa bỏ *MGF360*-12L, -13L và -14L khỏi bộ gen của chủng ASFV Pretoriuskop/96/4 làm giảm khả năng tái tạo của virus trong bộ ve (28). Quan trọng hơn, việc khôi phục các MGF đặc hiệu (*MGF360*-9L, -10L và -11L cùng với *MGF505*-1R hoặc *MGF360*-12L, -13L và -14L) trong BA71v đã thích ứng với tế bào Vero phục hồi một phần khả năng sao chép của virus trong đại thực bào lợn (27). Ngược lại, việc xóa bỏ *MGF360*-9L, -10L, -11L, -12L, -13L và -14L cùng với các gen *MGF505*-1R và -2R làm giảm đáng kể khả năng sao chép của chủng ASFV Pretoriuskop/96/4 trong đại thực bào lợn (27). Ngoài ra, việc xóa bỏ này làm mất

khả năng của virus Pretoriuskop/96/4 trong việc ức chế sự biểu hiện IFN loại I trong các đại thực bào ở lợn bị nhiễm bệnh thường được quan sát thấy trong các trường hợp nhiễm virus bố mẹ (29).

Sản phẩm gen ASFV NL (DP71L) tồn tại ở hai dạng khác nhau, dạng dài (184 amino acid) hoặc dạng ngắn (70 - 72 amino acid), tùy thuộc vào dòng ASFV phân lập (11). Việc xóa gen này ở chủng ASFV E70 (dạng ngắn) tạo ra virus giảm độc lực, trong khi việc xóa gen NL (DP71L) khỏi ASFV Malawi Lil-20/1 (dạng dài) hoặc Pretoriuskop/96/4 (dạng ngắn) đã không dẫn đến sự suy giảm virus (30). Điều thú vị là khi bộ gen của virus tái tổ hợp độc lực Malawi Lil-20/1-ΔNL (30) đã được biến đổi gen để tạo ra sự xóa bỏ các gen *MGF360* và *MGF505* tương tự như sự xóa bỏ được giới thiệu trong ASFV-G tạo ra ASFV-G-ΔMGF, virus được tạo ra cho thấy kiểu hình giảm độc lực ở lợn (31). Như các tác giả đã nêu, việc xóa các gen MGF này khỏi Malawi Lil-20/1-ΔNL đã bổ sung chức năng gen NL. Từ kết quả nghiên cứu đó, không thể phân biệt được liệu việc xóa các gen *MGF360* và *MGF505* khỏi chủng Malawi Lil-20/1 độc lực có làm suy giảm virus hay không. Ngoài ra, chủng ASFV Malawi Lil-20/1 thiếu gen NL và gen MGF theo báo cáo của Neilan *et al.* (31) không được thử nghiệm như một vaccin thử nghiệm để đánh giá hiệu quả bảo vệ do virus tái tổ hợp tạo ra chống lại thách thức với ASFV độc lực.

Tóm lại, chúng tôi báo cáo ở đây bằng chứng đầu tiên cho thấy việc xóa các thành viên của họ đa gen *MGF360* và *MGF505* có thể làm suy giảm sự phân lập ASFV độc lực cao. Ngoài ra, dữ liệu ASFV-G-ΔMGF là bằng chứng thực nghiệm duy nhất cho đến nay về chất kích thích sinh miễn dịch có thể tạo ra sự bảo vệ chống lại thách thức với chủng phân lập ASFV-G độc lực cao. Chắc chắn, việc sử dụng virus biến đổi gen làm vaccin sống giảm độc lực có thể gây rủi ro về an toàn. Ví dụ, cần phải đánh giá tác động lâu dài của sự phát triển của bệnh mạn tính như là hậu quả của việc lây nhiễm ASFV tái tổ hợp bị suy giảm độc lực cho động vật. Ngoài ra, phản ứng lâu dài của động vật được bảo vệ trước thách thức với virus độc hại cũng cần được giải quyết. Ở đây, chúng tôi đã quan sát thấy rằng một tỷ lệ các lợn bị thách thức, mặc dù được bảo vệ, nhưng lại chứa virus độc hại kiểu hoang dã. Ảnh hưởng lâu dài của tình trạng này không được biết đến.

Lời cảm ơn: Chúng tôi cảm ơn nhân viên Đơn vị chăm sóc động vật của Trung tâm dịch bệnh động vật Plum Island đã hỗ trợ kỹ thuật tuyệt vời. Chúng tôi muốn đặc biệt cảm ơn Melanie V. Prarat đã chỉnh sửa bản thảo.

Dự án này được tài trợ thông qua một thỏa thuận liên ngành với Cục Khoa học và công nghệ của Bộ An ninh nội địa Hoa Kỳ theo giải thưởng số. HSHQDC-11-X-00077 và HSHQPM-12-X-00005. Chúng tôi cảm ơn ARS / USDA - University of Connecticut (SCA số 58-1940-1-190) đã hỗ trợ một phần cho công việc này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Costard S, Wieland B, de Glanville W, Jori F, Rowlands R, Vosloo W, Roger F, Pfeiffer DU, Dixon LK. 2009. African swine fever: how can global spread be prevented? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:2683–2696. 10.1098/rstb.2009.0098.
- Tulman ER, Delhon GA, Ku BK, Rock DL. 2009. African swine fever virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 328:43–87.
- Chapman DA, Darby AC, Da Silva M, Upton C, Radford AD, Dixon LK. 2011. Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus. *Emerg Infect Dis* 17:599–605. 10.3201/eid1704.101283.
- Coggins L. 1974. African swine fever virus. Pathogenesis. *Prog Med Virol* 18:48–63.
- Kihm U, Ackerman M, Mueller H, Pool R. 1987. Approaches to vaccination, p 127–144. In Becker Y (ed), *African swine fever*. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, MA.
- Mebus CA. 1988. African swine fever. *Adv Virus Res* 35:251–269. 10.1016/S0065-3527(08)60714-9.
- Hamdy FM, Dardiri AH. 1984. Clinical and immunologic responses of pigs to African swine fever virus isolated from the Western Hemisphere. *Am J Vet Res* 45:711–714.
- Ruiz Gonzalvo F, Caballero C, Martinez J, Carnero ME. 1986. Neutralization of African swine fever virus by sera from African swine fever-resistant pigs. *Am J Vet Res* 47:1858–1862.
- Moore DM, Zsak L, Neilan JG, Lu Z, Rock DL. 1998. The African swine fever virus thymidine kinase gene is required for efficient replication in swine macrophages and for virulence in swine. *J Virol* 72:10310–10315.
- Lewis T, Zsak L, Burrage TG, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL. 2000. An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine. *J Virol* 74:1275–1285. 10.1128/JVI.74.3.1275-1285.2000.
- Zsak L, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL. 1996. An African swine fever virus virulence-associated gene NL-S with similarity to the herpes simplex virus ICP34.5 gene. *J Virol* 70:8865–8871.
- Zsak L, Caler E, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL. 1998. A nonessential African swine fever virus gene UK is a significant virulence determinant in domestic swine. *J Virol* 72:1028–1035.
- Almendral JM, Almazan F, Blasco R, Vinuela E. 1990. Multigene families in African swine fever virus: family 110. *J Virol* 64:2064–2072.
- González A, Calvo V, Almazan F, Almendral JM, Ramirez JC, de la Vega I, Blasco R, Vinuela E. 1990. Multigene families in African swine fever virus: family 360. *J Virol* 64:2073–2081.
- De la Vega I, Vinuela E, Blasco R. 1990. Genetic variation and multigene families in African swine fever virus. *Virology* 179:234–246. 10.1016/0042-6822(90)90293-Z.
- Rodriguez F, Alcaraz C, Eiras A, Yanez RJ, Rodriguez JM, Alonso C, Rodriguez JF, Escibano JM. 1994. Characterization and molecular basis of heterogeneity of the African swine fever virus envelope protein p54. *J Virol* 68:7244–7252.
- Vydelingum S, Baylis SA, Bristow C, Smith GL, Dixon LK. 1993. Duplicated genes within the variable right end of the genome of a pathogenic isolate of African swine fever virus. *J Gen Virol* 74(Pt 10):2125–2130.
- Yozawa T, Kutish GF, Afonso CL, Lu Z, Rock DL. 1994. Two novel multigene families, 530 and 300, in the terminal variable regions of African swine fever virus genome. *Virology* 202:997–1002. 10.1006/viro.1994.1426.
- Pires S, Ribeiro G, Costa JV. 1997. Sequence and organization of the left multigene family

- 110 region of the Vero-adapted L60V strain of African swine fever virus. *Virus Genes* 15:271–274. 10.1023/A:1007992806818.
20. Tabares E. 1987. Characterization of ASF virus proteins, p 51–62. In Becker Y. (ed) *African swine fever*. Martinus Nijhoff, Boston, MA.
 21. Yáñez RJ, Rodriguez JM, Nogal ML, Yuste L, Enriquez C, Rodriguez JF, Vinuela E. 1995. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology* 208:249–278. 10.1006/viro.1995.1149.
 22. Krug PW, Holinka LG, O'Donnell V, Reese B, Sanford B, Fernandez-Sainz I, Gladue DP, Arzt J, Rodriguez L, Risatti GR, Borca MV. 2015. The progressive adaptation of a Georgian isolate of African swine fever virus to Vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome. *J Virol* 89:2324–2332. 10.1128/JVI.03250-14.
 23. Boinas FS, Hutchings GH, Dixon LK, Wilkinson PJ. 2004. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J Gen Virol* 85:2177–2187. 10.1099/vir.0.80058-0.
 24. Enjuanes L, Carrascosa AL, Moreno MA, Vinuela E. 1976. Titration of African swine fever (ASF) virus. *J Gen Virol* 32:471–477. 10.1099/0022-1317-32-3-471.
 25. Martins CL, Lawman MJ, Scholl T, Mebus CA, Lunney JK. 1993. African swine fever virus specific porcine cytotoxic T cell activity. *Arch Virol* 129:211–225. 10.1007/BF01316896.
 26. Zsak L, Lu Z, Burrage TG, Neilan JG, Kutish GF, Moore DM, Rock DL. 2001. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes are novel macrophage host range determinants. *J Virol* 75:3066–3076. 10.1128/JVI.75.7.3066-3076.2001.
 27. Zsak L, Neilan JG. 2002. Regulation of apoptosis in African swine fever virus-infected macrophages. *ScientificWorldJournal* 2:1186–1195. 10.1100/tsw.2002.214.
 28. Burrage TG, Lu Z, Neilan JG, Rock DL, Zsak L. 2004. African swine fever virus multigene family 360 genes affect virus replication and generalization of infection in *Ornithodoros* porcinus ticks. *J Virol* 78:2445–2453. 10.1128/JVI.78.5.2445-2453.2004.
 29. Afonso CL, Piccone ME, Zaffuto KM, Neilan J, Kutish GF, Lu Z, Balinsky CA, Gibb TR, Bean TJ, Zsak L, Rock DL. 2004. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response. *J Virol* 78:1858–1864. 10.1128/JVI.78.4.1858-1864.2004.
 30. Afonso CL, Zsak L, Carrillo C, Borca MV, Rock DL. 1998. African swine fever virus NL gene is not required for virus virulence. *J Gen Virol* 79(Pt 10):2543–2547.
 31. Neilan JG, Zsak L, Lu Z, Kutish GF, Afonso CL, Rock DL. 2002. Novel swine virulence determinant in the left variable region of the African swine fever virus genome. *J Virol* 76:3095–3104. 10.1128/JVI.76.7.3095-3104.2002.
 32. Reed LJ, Muench HA. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 27:493–497.
 33. Neilan JG, Lu Z, Kutish GF, Zsak L, Lewis TL, Rock DL. 1997. A conserved African swine fever virus IkappaB homolog, 5EL, is nonessential for growth in vitro and virulence in domestic swine. *Virology* 235:377–385. 10.1006/viro.1997.8693.
 34. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463–5467. 10.1073/pnas.74.12.5463.
 35. Huang X, Madan A. 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9:868–877. 10.1101/gr.9.9.868.
 36. Neilan JG, Zsak L, Lu Z, Burrage TG, Kutish GF, Rock DL. 2004. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology* 319:337–342. 10.1016/j.virol.2003.11.011.
 37. Chapman DA, Tcherepanov V, Upton C, Dixon LK. 2008. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *J Gen Virol* 89:397–408. 10.1099/vir.0.83343-0.

Người dịch: **TS. Ngô Chung Thủy**, Viện Thú y, từ *Tạp chí Siêu vi trùng*, tháng 5/2015 (*Journal of Virology*, 5 May, 2015).