

# Nâng cao - tham khảo

## THỬ NGHIỆM VACCIN CHO ƯƠNG ĐẦU TIÊN TRÊN LỢN RỪNG Á-ÂU CHỐNG LẠI VIRUS DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI GENOTYPE II

*Jose A. Barasona<sup>1\*</sup>, Carmina Gallardo<sup>2†</sup>, Estefanía Cadenas-Fernández<sup>1</sup>, Cristina Jurado<sup>1</sup>, Belén Rivera<sup>1</sup>, Antonio Rodríguez-Bertos<sup>1,3</sup>, Marisa Arias<sup>2</sup> and Jose M. Sánchez-Vizcaíno<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup> Animal Health Department, Faculty of Veterinary, VISAVET Health Surveillance Centre, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, <sup>2</sup> European Union Reference Laboratory for ASF Centro de Investigación en Sanidad Animal (I NIA-CISA), Madrid, Spain, <sup>3</sup> Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain*

Dịch tả lợn châu Phi (ASF), mối đe dọa đáng kể nhất đối với ngành chăn nuôi lợn trên toàn thế giới, đã lan rộng đến hơn 55 quốc gia, trên 3 lục địa và nó ảnh hưởng đến hơn 77% quần thể lợn trên thế giới. Theo Liên minh châu Âu (EU), lợn rừng (*Sus Scrofa*) là vật chủ bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Những lý do chính cho sự lây lan chưa từng thấy và liên tục của ASF ở châu Âu là các hoạt động thương mại, sự di chuyển liên tục của lợn rừng bị nhiễm bệnh, số lượng lợn giữa các khu vực và thiếu vaccin để ngăn ngừa.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chứng minh rằng miễn dịch bằng đường miệng ở lợn rừng chưa lây nhiễm với chủng virus ASF nhược độc thuộc genotype II được phân lập ở Latvia năm 2017 (Lv17 / WB / Rie1) đã bảo hộ được 92% số lợn sau thử thách bởi virus ASF có độc lực (Arm07). Đây là báo cáo đầu tiên về một loại vaccin đầy hứa hẹn chống lại virus ASF trên lợn rừng qua đường uống.

Những nghiên cứu sâu hơn, lặp đi lặp lại và thử nghiệm quá liều đánh giá sự an toàn, xác minh tính ổn định di truyền của virus vaccin để xác nhận rằng: chủng virus Lv17/WB/Rie1 có thể được sử dụng cho lợn rừng trong kiểm soát ASF.

### I. GIỚI THIỆU

Dịch tả lợn châu Phi (ASF) là một trong những bệnh do virus gây thiệt hại nặng nề nhất trong

chăn nuôi lợn. Các chủng virus ASF (ASFV) gây sốt xuất huyết cấp tính và á cấp tính ở lợn nhiễm bệnh với tỷ lệ tử vong lên tới 100%. Do tác động đến kinh tế xã hội và số lượng lợn trong ổ dịch bị tiêu hủy quá lớn, ASF được Tổ chức Thú y Thế giới đưa vào danh sách những bệnh truyền nhiễm đáng chú ý.

Sau khi được phát hiện, chủng ASFV genotype II lây lan từ Đông Phi vào Georgia rồi lan sang Đông Âu từ năm 2007, lưu hành tại Liên minh châu Âu từ năm 2014 và ở châu Á từ năm 2018. Bằng các biện pháp kiểm soát, người ta thông báo bệnh tiếp tục lây từ lợn rừng (*Sus Scrofa*) sang lợn nhà ở các trang trại không có vaccin cũng như những biện pháp điều trị cụ thể để chống lại tác hại của loại virus này.

Các biện pháp kiểm soát chỉ bao gồm giảm số lợn nuôi và lợn hoang đã bị nhiễm, cũng như hạn chế việc vận chuyển, buôn bán lợn sống và các sản phẩm có nguồn gốc ở cấp khu vực, quốc gia và quốc tế.

Do đó, ASF đang là mối đe dọa đáng kể nhất đối với ngành chăn nuôi lợn hiện nay trên toàn thế giới.

Hiện tại, ASF ảnh hưởng đến hơn 55 quốc gia trên 3 châu lục, bao gồm cả Trung Quốc, nơi sản xuất gần 1/2 số lợn của thế giới.

Dịch tễ học của ASF rất khác nhau một cách

có ý nghĩa tùy thuộc vào đặc điểm của chủng virus lưu hành, sự hiện diện của vật chủ và ổ chứa hoang dã, an toàn sinh học trang trại, điều kiện môi trường và hành vi của con người.

Chín thành viên của Liên minh châu Âu đã báo cáo có sự lưu hành của ASFV trong 5 năm qua là: Litva, Ba Lan, Latvia, Estonia, Cộng hòa Séc, Romania, Hungary, Bulgaria và Bỉ. Trong tất cả các quốc gia ngoại trừ Romania, lợn rừng là vật chủ chính bị ảnh hưởng bởi căn bệnh này, chiếm hơn 90% các vụ dịch trong Liên minh.

Một phân tích dịch tễ học ở Estonia đã kết luận rằng sự hiện diện của ASFV trong lợn rừng là yếu tố nguy cơ chính gây ra dịch bệnh ở lợn nuôi trong nước. Sự truyền lây xuyên biên giới của ASF xảy ra do sự vận chuyển bất hợp pháp của lợn bị nhiễm bệnh, của thịt lợn hoặc các sản phẩm chế biến từ thịt lợn bị nhiễm ASFV. Đây vẫn là những yếu tố nguy cơ chính cho sự lây lan của ASF trên một khoảng cách địa lý lớn và lan truyền tại địa phương. Sự lây nhiễm còn xảy ra thông qua các quá trình nhiễm trùng bệnh ở lợn rừng trong tự nhiên, giữa virus đặc hữu trên quần thể lợn rừng ở Liên minh châu Âu.

ASF biểu hiện lâm sàng có thể từ cấp tính đến cận lâm sàng. Biểu hiện lâm sàng phụ thuộc vào độc lực của chủng virus gây bệnh, vật chủ, số lượng và đường lây nhiễm và các yếu tố khác. Thời gian ủ bệnh dao động từ 3 đến 19 ngày.

Các dấu hiệu và tổn thương lâm sàng liên quan đến xuất huyết như xuất huyết, phù, cổ trướng và sốt, cũng như rối loạn chức năng của hệ thống tiêu hóa và hô hấp. Tỷ lệ tử vong thay đổi từ 10 đến 100%, tùy thuộc vào độc lực của virus gây bệnh.

Các chủng ASFV genotype II gây dịch bệnh vùng Á-Âu có độc lực cao gây ra triệu chứng lâm sàng điển hình và có tỷ lệ tử vong lên đến gần 100% ở lợn nhà và lợn rừng. Tuy nhiên những báo cáo gần đây cho biết còn có các chủng ASFV độc lực trung bình đang lưu hành ở châu Âu.

Nhìn chung, việc phát triển vaccin đã bị cản trở bởi sự phức tạp di truyền của ASFV, những hiểu biết chưa đầy đủ về phương thức nhiễm trùng và miễn dịch của ASFV, vấn đề về kháng thể trung hòa và những khó khăn trong kỹ thuật nuôi cấy,

đặc biệt là thiếu các dòng tế bào ổn định.

Sự tái xuất hiện gần đây của ASF ở châu Âu đã dẫn đến việc phát triển một loại vaccin có hiệu quả chống lại ASF.

Nỗ lực tiêm phòng cho lợn sử dụng vaccin virus bất hoạt hoặc vaccin tiểu phần đã thất bại trong việc tạo ra khả năng miễn dịch bảo hộ.

Vaccin sống nhược độc do truyền đời liên tiếp trong nuôi cấy tế bào hoặc thông qua việc xóa gen có thể tạo ra sự bảo hộ một phần hoặc toàn bộ.

Trên thực tế, một số trình tự bộ gen ASFV hiện đã có sẵn, một số chủng virus nhược độc tự nhiên cũng đã được phân lập tại thực địa, một số chủng ASFV nhược độc cũng đã được tạo ra bằng việc xác định những gen liên quan đến độc lực và trốn tránh miễn dịch của virus có thể được lựa chọn để phát triển vaccin. Một chủng ASFV có độc lực yếu, không gây xuất huyết đã được phân lập vào năm 2017 từ một con lợn rừng ở Latvia (Lv17/WB/Rie1). Thí nghiệm gây nhiễm chủng virus này trên lợn nhà đã tạo sự bảo hộ hoàn toàn chống lại khả năng gây bệnh của chủng ASFV cường độc genotype II, cho thấy tiềm năng sử dụng Lv17/WB/Rie1 như một loại vaccin nhược độc.

Mặc dù rất quan tâm đến vaccin ASFV cho lợn rừng, chúng tôi nhận thức được các thử nghiệm tiêm chủng chỉ ở lợn nhà (xem tổng quan thư mục trong Bảng bổ sung 1). Tầm quan trọng của việc tiêm phòng lợn rừng đã được chứng minh trong những năm 2000 khi dịch tả lợn cổ điển ảnh hưởng đến các quốc gia châu Âu khác nhau. Mục đích của nghiên cứu thực nghiệm này là để đánh giá khả năng miễn dịch của lợn rừng với chủng Lv17/WB/Rie1 chống lại chủng ASFV cường độc genotype II phân lập (Arm07).

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Lợn thí nghiệm

18 con lợn rừng 3 - 4 tháng tuổi, nặng 10 - 15 kg được lấy từ một trang trại lợn rừng thương mại ở Extremadura, Tây Ban Nha. Lợn con chưa được tiêm phòng chống lại bất kỳ bệnh truyền nhiễm nào.

Lợn rừng thí nghiệm đã kiểm tra âm tính với các mầm bệnh chính của lợn trong khu vực: Aujeszky

virus, *Mycobacterium bovis*, *Mycoplasma pneumoniae* và Porcine circovirus type 2.

Lợn con được nuôi giữ tại phòng an toàn sinh học BSL-3 của Trung tâm VISAVET tại Đại học Madrid.

Lợn được thích nghi trong 2 tuần trước khi thí nghiệm bắt đầu. Trong quá trình thử nghiệm, lợn rừng tự do tiếp cận với thức ăn và nước uống. Tất cả các thí nghiệm được thực hiện theo quy định của châu Âu, quốc gia và khu vực và được chấp thuận bởi Ủy ban đạo đức của Tây Ban Nha.

## 2. Cách ly ASFV

Kiểu gen p72 II chủng Lv17/WB/Riel nhược độc không gây tan máu được sử dụng để tiêm chủng. Chủng này trước đây đã được thử nghiệm trên lợn nhà. Kiểu hình không tan máu có liên quan đến một adenosine giải phóng bằng cách tạo ra protein cắt từ CD2 giống như trình tự mã hóa trong gen EP402R (bằng sáng chế của Tây Ban Nha PCT/2018/000069). Việc xóa gen tại vị trí này tương ứng với gen ở vị trí 395 trong bộ gen tham chiếu ASFV Georgia 2007/1 (GenBank FR682468). Virus đã phát triển 7 ngày trong bạch cầu đơn nhân, sau đó môi trường nuôi cấy chứa virus ngoại bào được thu thập, ly tâm ở tốc độ thấp để loại bỏ các mảnh vụn của tế bào và sau đó ở mức tốc độ cao để lắng đọng virus. Các hạt lắng trong dung dịch muối đệm photphat (PBS), được chuẩn độ trong bạch cầu đơn nhân của máu lợn và được sử dụng trong các thí nghiệm gây miễn dịch.

Hiệu giá virus được định nghĩa là lượng virus gây ra bệnh lý 50% tế bào ( $TCID_{50}/ml$ ), theo ước tính của phương pháp nhuộm miễn dịch gắn men.

Đối với các thử nghiệm thử thách, ASFV cường độc, tan máu genotype II chủng Arm07 đã được sử dụng. Virus được nhân lên trong bạch cầu đơn nhân như mô tả. Hiệu giá virus được định nghĩa là lượng virus gây ra 50% hấp phụ hồng cầu trong môi trường nuôi cấy bị nhiễm ( $HAD_{50}/ml/TCID_{50}/ml$ ).

**Bảng 1. Một số tổ chức mô của lợn sau khi chết được xét nghiệm DNA của ASFV bằng kỹ thuật Real-time PCR**

Các mô được theo dõi	
Tủy xương	Hạch bạch huyết trung thất
Não	Hạch bạch huyết trung thất
Hạch lympho hệ tiêu hóa	Hạch bạch huyết
Tim	Hạch bạch huyết
Hạch lympho vùng bẹn	Hạch bạch huyết
Thận	Lách
Gan	Hạch dưới màng cứng
Phổi	Bàng quang tiết niệu

## 3. Miễn dịch và thử thách

12 con lợn rừng đã được nuôi dưỡng tại các cơ sở an toàn sinh học cấp 3 để tiến hành thử nghiệm tiêm chủng. Ban đầu, 9 con lợn rừng được cho uống vaccin với liều  $10^4$   $TCID_{50}$  của chủng Lv17/WB/Riel ASFV.

Sau đó, 3 con lợn rừng còn lại được tiếp xúc với 9 lợn được miễn dịch (sau đây gọi nhóm tiếp xúc là VContact) từ 7 và 15 ngày sau khi chúng ngừng để kiểm tra sự truyền ngang của virus vaccin tại các thời điểm khác nhau.

Thời gian theo dõi kéo dài 30 ngày để phát triển một đáp ứng miễn dịch. Sau đó, một mô hình phơi nhiễm với lợn thử thách với lợn gây nhiễm virus cường độc để đánh giá khả năng miễn dịch bảo hộ: 9 lợn được tiêm phòng đã tiếp xúc với 4 con lợn rừng khác. Những con lợn rừng này được tiêm bắp với liều 10  $HAD_{50}$  của chủng ASFV Arm07 cường độc cùng ngày.

Vào 30 ngày sau tiêm phòng, 2 con lợn rừng khác (tiếp xúc muộn) đã được tiếp xúc với tất cả những lợn thí nghiệm ở lô tiêm phòng vaccin, và lợn gây nhiễm virus cường độc.

Như vậy, tất cả 12 con lợn rừng đã được tiêm phòng, 4 con lợn rừng tiêm bắp với chủng Arm07 cường độc và 2 con lợn rừng tiếp xúc muộn đều được theo dõi trong 24 ngày sau thử thách, tương ứng với 54 ngày sau tiêm chủng.

Trong thời gian này, mọi hoạt động của đàn lợn được theo dõi 24/24 bằng máy quay video. Dấu hiệu lâm sàng được ghi nhận hàng ngày như mô tả, những dấu hiệu lâm sàng bao gồm chán ăn, xuất huyết da hoặc tím tái, sưng khớp, suy hô hấp, tiết dịch mắt và biểu hiện tiêu hóa.

Các mẫu máu và huyết thanh chứa EDTA được thu thập 2 lần/tuần. Nhiệt độ trực tràng được đo 2 lần/tuần trước khi lấy mẫu lợn cũng như ở lợn có bất kỳ dấu hiệu lâm sàng nào sau khi tiêm vaccin. Sự hiện diện của bộ gen ASFV trong máu được xác định bằng phương pháp realtime PCR. Các mẫu huyết thanh được xét nghiệm kháng thể bằng kit ELISA thương mại (Ingenasa/Ingezim PPA Compac K3; Ingenasa, Madrid, Tây Ban Nha) và sử dụng xét nghiệm miễn dịch men (immunoperoxidase - IPT).

#### 4. Mô và lấy mẫu

Vào cuối giai đoạn quan sát (54 ngày sau khi tiêm chủng), lợn sống sót được gây mê bằng cách tiêm bắp kết hợp thuốc gây mê tommeamine-zolazepam (Zoletil R 100mg/ml, Virbac, Pháp, liều đích 3 mg/kg) và medetomidine (Virbac, Pháp, liều đích 0,05 mg/kg), sau đó được trung hòa bằng T61 tiêm tĩnh mạch.

Mổ khám nghiệm lợn chết được thực hiện để phát hiện sự hiện diện các tổn thương vĩ mô tương thích với ASF. 16 mẫu mô khác nhau (được liệt kê

trong bảng 1), bao gồm tất cả các hạch bạch huyết chính và các cơ quan nội tạng đích, được lấy từ mỗi cá thể và được thử nghiệm bằng phương pháp realtime PCR để phát hiện ASFV. Phân lập virus được thực hiện từ một tập hợp các mô, sử dụng quy trình đã được thiết lập.

#### 5. Phân tích thống kê

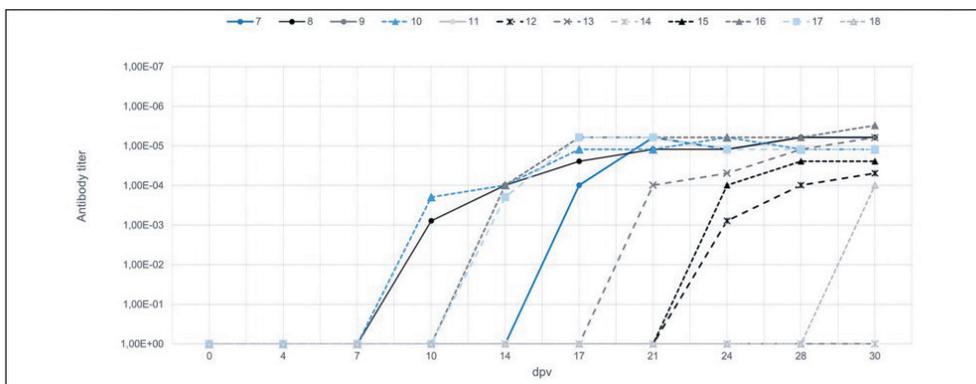
Đường cong sinh tồn của Kaplan-Meier và test xếp hạng Mantel-Cox đã được sử dụng. Tương ứng, để tính xác suất tử vong và kiểm tra sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ sống sót giữa các nhóm, test MannWhitney U và mối tương quan Spearman đã được sử dụng để so sánh giá trị Ct từ real-time PCR giữa các nhóm thí nghiệm.

Dữ liệu được phân tích bằng SPSS 20 (IBM, Somar, NY, USA) tại mức ý nghĩa 0,05.

### III. CÁC KẾT QUẢ

#### 1. Kết quả trong thời gian tiêm chủng

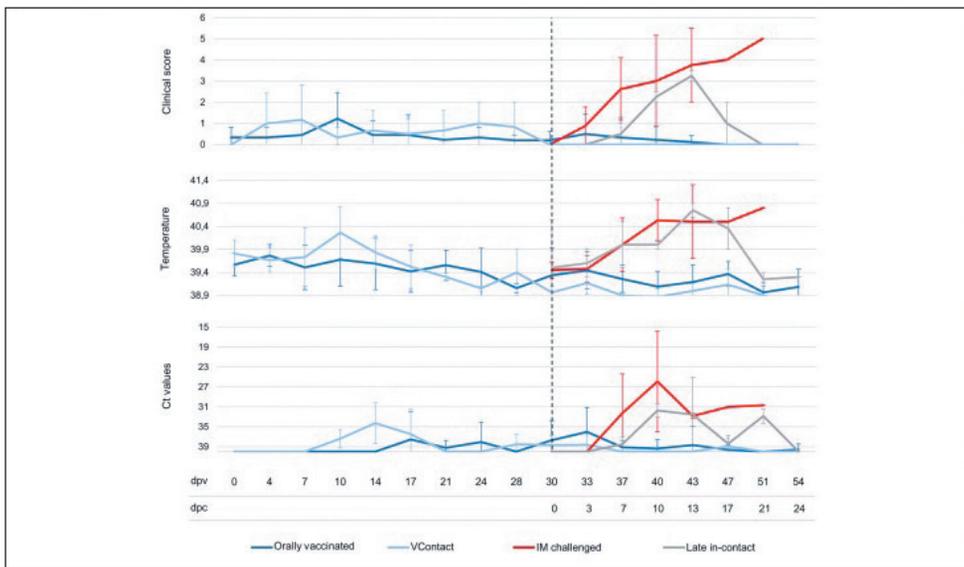
Trong thời gian tiêm chủng 30 ngày, 6/9 lợn rừng cho uống vaccin cho thấy có kháng thể dương tính kháng thể kháng ASFV bằng xét nghiệm ELISA và IPT bắt đầu từ  $15 \pm 3$  ngày sau tiêm phòng (hình 1). Tất cả 3 con lợn rừng miễn dịch tiếp xúc cho thấy xuất hiện kháng thể dương bắt đầu từ  $14 \pm 2$  ngày và kháng thể tồn tại trong suốt thử nghiệm (hình 1).



Hình 1. Chuẩn độ kháng thể kháng ASFV ở lợn rừng được dùng vaccin qua miệng Lv17/WB/Riel (màu xám) và lợn rừng tiếp xúc với động vật đã được phòng (màu xanh da trời). Các động vật sau được tiếp xúc thông qua tiếp xúc bắt đầu từ 0 ngày (ID7), 7 ngày (ID10) và 15 ngày (ID17) sau khi dùng vaccin. Kết quả xác định bằng xét nghiệm immunoperoxidase gián tiếp.

Kết quả này chỉ ra rằng sử dụng vacxin bằng đường cho uống chủng Lv17/WB/Rie1 có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch ở lợn rừng. Không có dấu hiệu lâm sàng tương thích ASF được phát hiện ở những lợn được chủng ngừa với Lv17/WB/Rie1. Phản ứng lâm sàng duy nhất phát hiện thấy là nhiệt độ cơ thể tăng nhẹ lên 40,1-40,8°C ở 7/9 lợn đã được miễn dịch và ở 1/3 lợn tiếp xúc, kéo dài trung bình 3,5 ngày từ 4 đến 24 ngày sau khi tiêm

chủng (hình 2). Nhiễm virus đạt đỉnh vào những ngày khác nhau ở lợn. Trong 6/9 lợn được miễn dịch và 2/3 lợn rừng tiếp xúc, kết quả realtime PCR cho thấy kết quả dương tính yếu ( $Ct = 33,02 \pm 4,07$ ) sau thời gian tiêm chủng 30 ngày. Nhiễm virus đỉnh điểm cho thấy một mối tương quan yếu với sự gia tăng nhẹ của thân nhiệt trong cơ thể (hình 2).



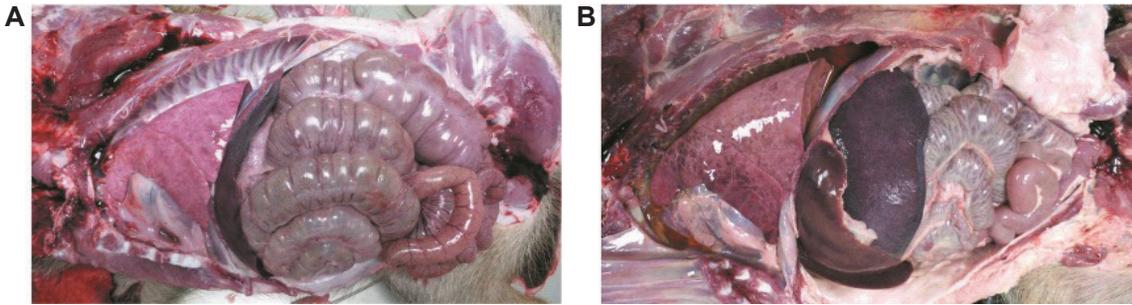
Hình 2. Trung bình điểm lâm sàng, nhiệt độ cơ thể và giá trị Ct từ real-time PCR của lợn rừng được uống với Lv17/WB/Rie1 ( $n = 9$ , màu xanh đậm), tiếp xúc (VContact,  $n = 3$ , màu xanh nhạt), các biện pháp kiểm soát tiêm bắp với ASFV Arm07 cường độc ( $n = 4$ , màu đỏ) và lợn rừng tiếp xúc muộn ( $n = 2$ , màu xám). Trung bình được hiển thị tại các ngày khác nhau sau tiêm chủng (dpv), bao gồm cả những ngày sau thử thách (dpc).

## 2. Kết quả sau thử thách

Đáp ứng miễn dịch ở lợn đã được tiêm phòng và lợn tiếp xúc có khả năng bảo hộ chống lại Arm07 cường độc. Sau khi tiếp xúc với mầm bệnh, 11/12 lợn được tiêm phòng và lợn tiếp xúc sống sót (92%). Hơn nữa, trong số đó không phát hiện bất kỳ dấu hiệu lâm sàng tương thích ASF hoặc tổn thương mô sau khi thử thách. Hai cá thể lợn uống vacxin không có phản ứng kháng thể kháng ASFV hoặc tăng nhiệt độ cơ thể trong 30 ngày sau thời kỳ tiêm chủng, phát triển đỉnh virus không liên tục sau thử thách nhưng lại có phản ứng kháng thể dương tính ở 3 và 7 ngày sau thử thách, tức là ở thời điểm

tương ứng với 33 và 37 ngày sau khi tiêm phòng.

Ngược lại, tất cả các lợn nhận được thử thách tiêm bắp đã thể hiện các dấu hiệu lâm sàng nghiêm trọng tương thích với ASF (hình 2). Những con vật này đã chết trong khoảng từ 7 đến 20 ngày sau gây nhiễm (Mantel-Cox,  $\chi^2 = 18,88$ , 1 ngày;  $p < 0,001$ ). Hai lợn tiếp xúc muộn có dấu hiệu lâm sàng tương tự như những lợn bị gây nhiễm virus cường độc (hình 2), tuy nhiên lợn tiếp xúc muộn đã có phản ứng kháng thể ở 7 và 9 ngày sau thử thách, và sau đó đã phục hồi sức khỏe và sống sót. Trong số 9 lợn được phòng, có một con đã không qua khỏi thử thách và thể hiện dấu hiệu lâm sàng ASF tương tự



**Hình 3. Hình ảnh khoang ngực và khoang bụng từ (A) lợn rừng được dùng vaccin với Lv17/WB/Rie1 và (B) gây nhiễm chủng độc chủng ASFV Arm07. Tràn dịch màng phổi, sưng gan và lách to được thấy rõ trong hình B**



**Hình 4. Quan sát ngoại tâm mạc tim (I), thận (II) và bề mặt niêm mạc của ruột (III) từ lợn rừng (A) được dùng vaccin với Lv17/WB/Rie1 và (B) gây nhiễm chủng cường độc với ASFV Arm07. (B) cho thấy xoang tim tích nước (IB), thận sưng huyết cấp, xuất huyết trên bề mặt vỏ thận (IIB) và nhiều điểm xuất huyết cấp tính trên bề mặt niêm mạc của đại tràng (IIIB)**

như quan sát thấy trong thử thách tiêm bắp. Lợn rừng này không có đáp ứng miễn dịch.

Tất cả cá thể trong nhóm lợn gây nhiễm bởi virus cường độc đều phát hiện thấy kháng thể bắt đầu từ 6

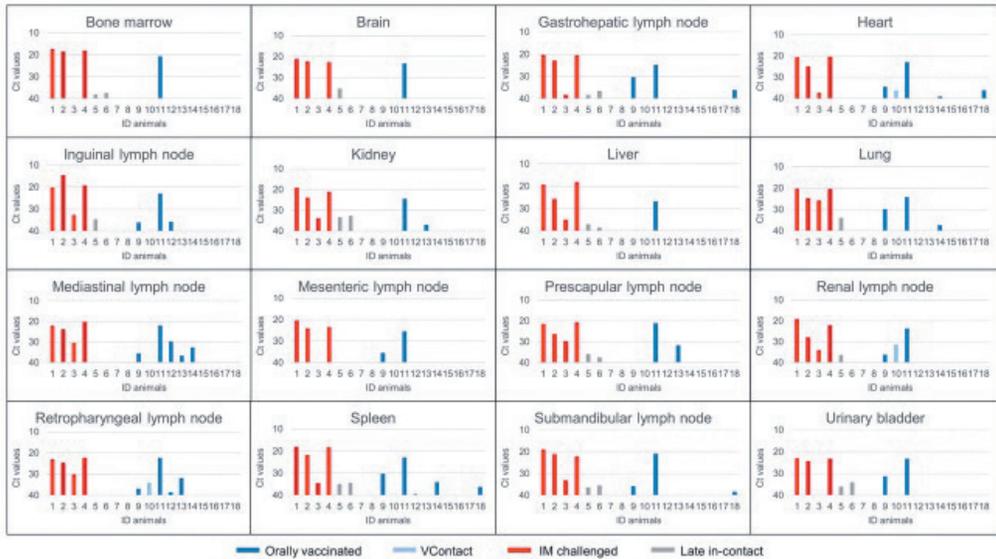
-12 ngày sau khi thử thách và cho đến khi chết ( $C_t = 23,65 \pm 4,68$ ). Hai lợn tiếp xúc muộn cũng có kháng thể từ 6 - 11 ngày sau thử thách cho đến 21 ngày ( $C_t = 32,74 \pm 1,11$ ). 4/8 lợn còn sống được dùng vaccin và một trong 3 con lợn rừng tiếp xúc lẻ tẻ có virus ở máu sau thử thách ( $C_t = 34,56 \pm 1,60$ ). Lợn được tiêm phòng đã không bảo hộ, khi thử thách cường độ ở giá trị  $C_t$  tương tự như lợn gây nhiễm virus cường độ bằng tiêm bắp ( $C_t = 26,31 \pm 1,73$ ).

Nói chung, giá trị  $C_t$  của virus máu từ realtime PCR cao hơn đáng kể so với lợn sống sót không được bảo hộ hoặc ở nhóm lợn gây nhiễm cường độ. (thử nghiệm Mann-Whitney U,  $Z = .82,84$ ,  $p < 0,01$ ) (hình 2). Các phân tích sau khám nghiệm cho thấy bệnh lý tương thích ASF chỉ có ở lợn chưa được tiêm phòng và gây nhiễm cường độ.

Những phát hiện chính là chất lỏng từ màu vàng đến hơi đỏ trong khoang bụng (cổ trướng), tràn dịch màng phổi và trong ngoại tâm mạc. Tắc nghẽn nói chung và xuất huyết khu trú đã được quan sát trên bề mặt phổi, lách (lách to), hạch bạch huyết (xuất huyết viêm hạch bạch huyết), thận, niêm mạc miệng (xuất huyết lan tỏa viêm bàng quang) và niêm mạc dạ dày (hình 3, 4).

Gen DNA của ASFV không được phát hiện ở bất kỳ trong số 16 các mô được phân tích ở 3 trong số 8 lợn được dùng vaccin sống sót và 2 trong số 3 lợn tiếp xúc. Ở những lợn sống sót còn lại cho thấy kết quả PCR dương tính yếu ( $C_t = 38,416 \pm 1,16$ ) trong 5 mô. ASFV phân lập được từ 2 trong số 22 mô được phân tích từ những nhóm lợn này, đó là hạch bạch huyết ở một cá thể lợn đã được uống vaccin và thận, hạch bạch huyết trong 1 cá thể lợn tiếp xúc. Những phân lập virus này là không xuất huyết. Hai con lợn rừng tiếp xúc muộn cho thấy, kết quả PCR dương tính yếu ở 9 hoặc 12 mô ( $C_t = 37,40 \pm 0,43$ ), trong trường hợp này, virus ASFV hấp phụ hồng cầu chỉ được phân lập từ một hạch bẹn. Ngược lại, DNA virus được phát hiện ở hầu hết 16 mô được phân tích từ 4 lợn gây nhiễm cường độ và mức độ cao hơn đáng kể ( $C_t = 21,59 \pm 1,26$ ) so với nhóm lợn sống sót (thử nghiệm Mann-Whitney U,  $Z = 0.652,65$ ,  $p < 0,01$ ). Trong trường hợp này, ASFV xuất huyết được phân lập từ một số mô. Theo cách tương tự, ở một lợn được dùng vaccin nhưng không được bảo hộ chống lại virus cường độ.

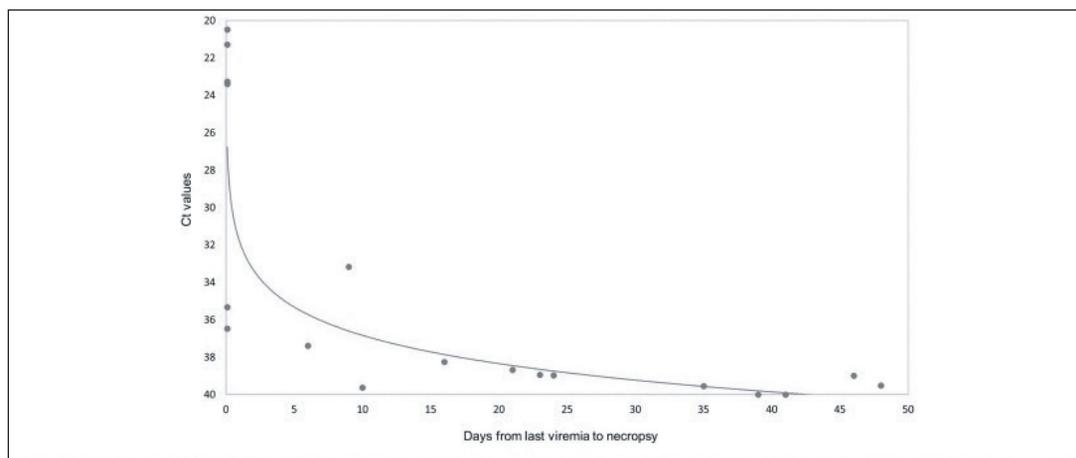
Kết quả PCR ( $C_t = 23,32 \pm 1,60$ ) trong tất cả 16 mô được thử nghiệm. Những kết quả được tóm tắt trong hình 5.



**Hình 5. Nồng độ DNA ASFV (giá trị  $C_t$  của real-time PCR) trong các mô của lợn chết**  
 Màu xanh đậm: lợn uống vaccin; màu xanh nhạt: lợn VContact; màu đỏ: lợn gây nhiễm chủng cường độ và màu xám: lợn tiếp xúc muộn.

Một lợn duy nhất được uống vaccin nhưng không bảo hộ sau khi thử thách cường độc cho kết quả dương tính mạnh với DNA của ASF ở một số mô ( $C_t=23,32 \pm 1,60$ ), tương tự nhóm lợn gây nhiễm cường độc.

Lượng genome của virus tương quan nghịch với khoảng giữa lần cuối của virus huyết được phát hiện và phân tích sau khi chết (xếp hạng Spearman tương quan,  $r = 0.80.853$ ,  $p < 0,001$ ; hình 6).



Hình 6. So sánh nồng độ DNA ASFV (giá trị  $C_t$  từ kết quả real-time PCR) trong 16 mô sau khi lợn chết với số ngày kể từ lần nhiễm virus cuối cùng được phát hiện cho đến khi hoại tử. Các giá trị  $C_t$  có liên quan nghịch với mức độ bộ gen của virus.

#### IV. THẢO LUẬN

Trong điều kiện thí nghiệm, virus ASF nhược độc tự nhiên được phân lập (chủng Lv17/WB/Rie1) (25) đã được thử nghiệm dưới dạng vaccin cho lợn rừng. Vì mục tiêu của vaccin này sẽ là phòng bệnh cho lợn rừng, trong lĩnh vực này, chúng tôi đã chú ý sử dụng vaccin bằng cách uống, đã thu được kết quả như trong thí nghiệm trước đây của lợn rừng ở Đức (30). Kết quả cho thấy chủng Lv17/WB/Rie1 bảo hộ 92% lợn được uống vaccin và tiếp xúc chống lại thử thách bằng chủng cường độc Arm07. Sự bảo hộ này không chỉ là sống sót mà còn không có dấu hiệu lâm sàng tương thích ASF, không phát hiện biến đổi bệnh lý và virus trong các mô đích. Đây sẽ là vaccin uống đầu tiên chống lại ASFV genotype II được thử nghiệm trong tự nhiên trên lợn rừng. Việc sử dụng vaccin này sẽ nhằm mục đích giảm số lượng lợn nhạy cảm, tăng miễn dịch đàn trong quần thể lợn rừng, và do đó, giảm tỷ lệ mắc ASF. Nghiên cứu *in vivo* hoàn chỉnh này cung cấp chi tiết về lâm sàng và phát hiện bệnh lý, đáp ứng miễn dịch, thời kỳ nhiễm virus và phát hiện DNA virus ở 16 mô và

cơ quan đích. Khi so sánh các kết quả này với các nghiên cứu thử nghiệm trước đây về vaccin thử nghiệm trên lợn nhà, hiệu quả bảo hộ chống lại thử thách là rõ rệt. Mặc dù kết quả thu được trong các nhóm lợn thí nghiệm khác nhau, hiệu quả bảo hộ cao ở lợn rừng được quan sát trong nghiên cứu này là phù hợp với kết quả trước đó thu được với Lv17/WB/Rie1 ở thí nghiệm 2 lợn nhà được tiêm bắp và 4 lợn tiếp xúc (25). Do đó, chủng virus nhược độc tự nhiên này dường như có hiệu quả hơn các chủng khác đã được làm giảm độc bằng cách cấy chuyển liên tiếp trong các tế bào (31) hoặc bằng thao tác di truyền đã không gây ra miễn dịch chống lại virus gốc (32 - 34). Theo nghĩa này, các nghiên cứu sâu hơn về bảo hộ chéo cần được tiến hành với Lv17/WB/Rie1 đối với các chủng ASFV khác nhau, vì ASFV Arm07 cường độc được sử dụng làm thử thách trong nghiên cứu này cũng thuộc kiểu gen II. Có nhiều nghiên cứu về việc thu được ASFV nhược độc vaccin bằng kỹ thuật di truyền, nó có thể được coi là một công cụ tiềm năng để cải thiện vaccin ứng cử viên, cho phép xóa các gen độc lực để tối đa hóa sự an toàn, nhưng cần nhớ rằng một

số gen có vai trò bảo hộ thiết yếu cần phải được duy trì. Như trường hợp của ASFV nhược độc chủng NH/P68, có thể bảo hộ toàn diện chống lại Arm07, nhưng sau khi thao tác di truyền, các đột biến xóa đã được thử nghiệm cho đến nay không thể hiện khả năng bảo hộ hoàn toàn để chống lại thử thách với chủng virus độc lực, làm giảm hiệu quả của các ứng cử viên đó (23). Quan sát của chúng tôi cho thấy 3 con lợn rừng đã có miễn dịch thông qua tiếp xúc chỉ ra rằng lợn được uống vaccin có thể thải ra virus tương ứng. Điều này cũng đã được mô tả với vaccin ASFV chủng NH/P68 nhược độc (23), nó có thể làm tăng hiệu giá miễn dịch do tiêm chủng, giảm giá thành sản xuất và quản lý vaccin ở quy mô lớn. Mặt khác, việc bài xuất virus vaccin có nghĩa là những con lợn rừng phục hồi này trở nên mang trùng làm cho mầm bệnh tồn tại dai dẳng (18, 19, 35, 36). Tuy nhiên, 2 nghiên cứu dài hạn cho thấy sau hết lâm sàng từ ASF, lợn bị nhiễm ASFV có độc lực vừa phải có thể loại bỏ virus từ huyết thanh và mô, và đã không truyền virus cho lợn bên cạnh (37, 38). Trên thực tế, những con vật còn sống sót cho thấy hiệu giá kháng thể cao trong hơn 3 tháng sau khi nhiễm trùng ban đầu (37). Những kết quả này phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi, ở thí nghiệm dùng vaccin cho uống và lợn rừng tiếp xúc duy trì chuẩn độ kháng thể cao (hình 1). Trong khi virus vẫn tồn tại trong máu (hình 2) và sự hiện diện của DNA virus trong các mô (hình 6) giảm trong quá trình thí nghiệm, thậm chí sau khi thách thức cường độc. Sự phân lập Lv17/WB/Rie1 chỉ phát hiện từ 2 mô của tất cả lợn uống vaccin và lợn tiếp xúc vào cuối thí nghiệm cho thấy nguy cơ nhiễm trùng thấp sau giai đoạn nhiễm virus (25), mặc dù kết quả này chỉ là bước đầu vì chưa thể phân lập được virus từ tất cả các mô khác. Ngoài ra, nghiên cứu dài hạn là cần thiết để đánh giá khả năng của Lv17/WB/Rie1 tồn tại và được truyền đi giữa các nhóm lợn rừng theo dõi. Điều này đặc biệt quan trọng khi nghiên cứu về khả năng của lợn đóng vai trò mang ASFV, có thể phụ thuộc vào chủng virus (18, 19, 35 - 38). Các nghiên cứu sâu hơn cũng cần thiết để đánh giá sự an toàn của Lv17/WB/Rie1 dưới dạng vaccin, chẳng hạn như để thiết lập những gì xảy ra khi lợn nhận được quá liều và để kiểm tra các tuyến phát tán virus theo thời gian (20, 39, 40).

Việc không có khả năng phát hiện DNA của

ASFV bằng PCR trong 3 trong số 8 lợn còn sống được uống vaccin và 2 trong số 3 lợn tiếp xúc trong quá trình phân tích mô sau khi chết cho thấy rằng những con vật này đã loại bỏ hoàn toàn virus. Các lợn thí nghiệm còn lại sống sót cho kết quả PCR dương tính yếu, chủ yếu ở các hạch bạch huyết sau màng phổi và dưới màng cứng, điều đó chỉ ra rằng lợn đã không loại bỏ virus vaccin hoặc chúng có khả năng đã loại bỏ nó nhưng đã bị tái nhiễm bởi virus tồn tại trong các giai đoạn nhiễm virus trước đó. Virus này rất có thể là Lv17/WB/Rie1 vì tất cả phân lập từ những lợn còn sống sót này đã không phát hiện thấy hiện tượng xuất huyết. Ngược lại, nhóm đối chứng bằng thử thách tiêm bắp và một lợn rừng được tiêm vaccin đã không được bảo hộ cho thấy kết quả PCR dương tính mạnh trong toàn bộ biểu mô được phân tích (hình 5) và DNA của virus phân lớn giống như là chủng thử thách Arm07, vì các phân lập virus được đều có tính hấp phụ hồng cầu. Những phát hiện này cho thấy virus Lv17/WB/Rie1 có thể được loại bỏ và không có khả năng truyền ngang một cách hiệu quả trong thời gian dài hạn, ít nhất là ở liều và đường sử dụng vaccin trong nghiên cứu này, phù hợp lượng DNA virus tương quan với lượng virus huyết và kết quả mổ khám cuối (hình 6).

Phân tích của chúng tôi cho thấy rằng tiêm chủng đã giúp 2 lợn rừng tiếp xúc muộn đã phục hồi sau khi nhiễm ASFV. Ban đầu sau thử thách nhiễm virus, nhiệt độ và dấu hiệu lâm sàng tương tự như lợn được thử thách tiêm bắp (hình 2), và ASFV Arm07 virus huyết, thậm chí còn phân lập được ASFV từ hạch bạch huyết bẹn của một lợn tiếp xúc muộn.

Tuy nhiên hai lợn tiếp xúc muộn còn lại cho thấy phản ứng kháng thể cao ở 7 - 9 ngày sau thử thách và giảm dấu hiệu lâm sàng và nhiễm virus huyết (hình 2). Quan sát của chúng tôi cho thấy rằng cả 2 lợn tiếp xúc muộn này đều có sự hiện diện của DNA ASFV trong các mô tương tự như lợn được uống vaccin và tiếp xúc sống sót (hình 5). Như vậy, có khả năng phản ánh thực tế là lợn tiếp xúc muộn đã được tiếp xúc với cả 2 chủng virus cùng một lúc. Trong thực tế, lâm sàng phục hồi và loại bỏ virus ở lợn tiếp xúc muộn cho thấy: Lv17/WB/Rie1 có thể là một loại vaccin có hiệu quả cao, bảo hộ được lợn ngay cả khi có mặt chủng Arm07

cường độ. Những kết quả này cần được xác minh và mở rộng trong các nghiên cứu tiếp theo về việc tiếp xúc với lợn ở cả 2 nhóm gây nhiễm cường độ và uống vaccin virus.

Đây là báo cáo đầu tiên về sử dụng vaccin cho uống ở lợn rừng chống lại ASFV genotype II, và báo cáo đầu tiên về dùng vaccin cho uống chống lại bất kỳ chủng ASFV nào trong lợn rừng. Trong bối cảnh hiện tại của bệnh xuyên biên giới này, một loại vaccin uống chống lại ASFV cho lợn rừng là rất cần thiết.

Do không có biện pháp kiểm soát có hiệu quả nào được áp dụng trong tự nhiên đến quần thể lợn rừng (7, 13, 41), nếu sự an toàn của Lv17/WB/Rie1 dưới dạng vaccin có thể được thiết lập, thì nó có thể giúp giảm thiểu sự lây lan không kiểm soát của ASFV trên khắp châu Âu, tương tự như thành công trong việc ngăn chặn sự lây lan của dịch tả lợn cổ điển.

Các nghiên cứu trong tương lai nên kiểm tra sự an toàn của vaccin lặp đi lặp lại hoặc quá liều, sự ổn định di truyền của virus vaccin, sự ổn định về đáp ứng miễn dịch bảo hộ dựa trên xét nghiệm huyết thanh học DIVA.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Sanchez-Vizcaino JM, Arias M. African swine fever. In: Zimmerman JJ, editor. *Diseases of Swine*, 396-404. Available online at: [https://www.wiley.com/en-us/\\$+of\\$+Swine%2C\\$+10th\\$+SEdition-p-9780813822679](https://www.wiley.com/en-us/$+of$+Swine%2C$+10th$+SEdition-p-9780813822679)
- Rowlands RJ, Michaud V, Heath L, Hutchings G, Oura C, Vosloo W, et al. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg Infect Dis.* (2008) 14:1870-4. doi: 10.3201/eid1412.080591
- OIE World Animal Health Information System. Available online at: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/reportarchive](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/reportarchive)
- Costard S, Mur L, Lubroth J, Sanchez-Vizcaino JM, Pfeiffer DU. Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res.* (2013) 173:191-7. doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.030
- Gallardo C, Nieto R, Soler A, Pelayo V, Fernandez-Pinero J, Markowska-Daniel I, et al. Assessment of African swine fever diagnostic techniques as a response to the epidemic outbreaks in Eastern European Union countries: how to improve surveillance and control programs. *J Clin Microbiol.* (2015) 53:2555-65. doi: 10.1128/JCM.00857-15
- Jurado C, Martinez-Aviles M, De La Torre A, Stukelj M, de Carvalho Ferreira HC, Cerioli M, et al. Relevant measures to prevent the spread of African swine fever in the European Union domestic pig sector. *Front Vet Sci.* (2018) 5:77. doi: 10.3389/fvets.2018.0007
- Sanchez-Cordon PJ, Montoya M, Reis AL, Dixon LK. African swine fever: a re-emerging viral disease threatening the global pig industry. *Vet J.* (2018) 233:41-8. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.12.025
- Sanchez-Vizcaino JM, Mur L, Gomez-Villamandos JC, Carrasco L. An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J Comp Pathol.* (2015) 152:9-21. doi: 10.1016/j.jcpa.2014.09.003
- Nurmoja I, Motus K, Kristian M, Niine T, Schulz K, Depner K, et al. Epidemiological analysis of the 2015-2017 African swine fever outbreaks in Estonia. *Prev Vet Med.* (2018). doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.10.001. [Epub ahead of print].
- Vergne T, Gogin A, Pfeiffer DU. Statistical exploration of local transmission routes for African swine fever in Pigs in the Russian Federation, 2007-2014. *Transbound Emerg Dis.* (2017) 64:504-12. doi: 10.1111/tbed.12391
- Zhou X, Li N, Luo Y, Liu Y, Miao F, Chen T, et al. Emergence of African swine fever in China, 2018. *Transbound Emerg Dis.* (2018) 65:1482-4. doi: 10.1111/tbed.12989
- De la Torre A, Bosch J, Iglesias I, Mu-oz MJ, Mur L, Martinez-Lopez B, et al. Assessing the risk of African swine fever introduction into the European Union by wild boar. *Transbound Emerg Dis.* (2015) 62:272-9. doi: 10.1111/tbed.12129
- Arias M, Jurado C, Gallardo C, Fernández-Pinero J, Sánchez-Vizcaino JM. Gaps in African swine fever: analysis and priorities. *Transbound Emerg Dis.* (2018) 65:235-47. doi: 10.1111/tbed.12695
- Gabriel C, Blome S, Malogolovkin A, Parilov S, Kolbasov D, Teifke JP, et al. Characterization of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars. *Emerg Infect Dis.* (2011) 17:2342-5. doi: 10.3201/eid1712.110430
- Blome S, Gabriel C, Dietze K, Breithaupt A, Beer M. High virulence of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars of all ages. *Emerg Infect Dis.* (2012) 18:708. doi: 10.3201/eid1804.111813
- Guinat C, Gogin A, Blome S, Keil G, Pollin R, Pfeiffer DU, et al. Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions. *Vet Rec.* (2016) 178:262-7. doi: 10.1136/vr.103593
- Ge S, Li J, Fan X, Liu F, Li L, Wang Q, et al. Molecular characterization of African Swine Fever Virus, China, 2018. *Emerg Infect Dis.* (2018) 24:2131- doi: 10.3201/eid2411.181274
- Zani L, Forth JH, Forth L, Nurmoja I, Leidenberger S, Henke J, et al. Deletion at the 5x-end of Estonian ASFV strains associated with an attenuated phenotype. *Sci Rep.* (2018) 8:1-11. doi: 10.1038/s41598-018-24740-1
- Gallardo C, Nurmoja I, Soler A, Delicado V, Simón A, Martín E, et al. Evolution in Europe of African swine fever genotype II viruses from highly to moderately virulent. *Vet Microbiol.* (2018) 219:70- doi: 10.1016/j.vetmic.2018.04.001
- Arias M, de la Torre A, Dixon L, Gallardo C, Jori F, Laddomada A, et al. Approaches and perspectives for

- development of African Swine fever virus vaccines. *Vaccines*. (2017) 5:35. doi: 10.3390/vaccines5040035
21. Neilan JG, Zsak L, Lu Z, Burrage TG, Kutish GF, Rock DL. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology*. (2004) 319:337–42. doi: 10.1016/j.virol.2003.11.011
  22. Gómez-Puertas P, Rodríguez F, Oviedo JM, Brun A, Alonso C, Escribano JM. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology*. (1998) 471:461–71. doi: 10.1006/viro.1998.9068
  23. Gallardo C, Sánchez EG, Pérez-Nú- ez D, Nogal M, de León P, Carrascosa ÁL, et al. African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses. *Vaccine*. (2018) 36:2694–704. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.03.040
  24. Garigliany M, Desmecht D, Tignon M, Cassart D, Lesenfant C, Paternostre J, et al. Phylogeographic analysis of African swine fever virus, Western Europe, 2018. *Emerg Infect Dis*. (2018) 25:184–6. doi: 10.3201/eid2501.181535
  25. Gallardo C, Soler A, Rodze I, Nieto R, Cano-Gomez C, Fernandez-Pinero J, et al. Attenuated and non-haemadsorbing (non-HAD) genotype II African swine fever virus (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017. *Transbound Emerg Dis*. (2019). doi: 10.1111/tbed. 13132. [Epub ahead of print].
  26. Carrascosa AL, Bustos MJ, de Leon P. Methods for growing and titrating African swine fever virus: field and laboratory samples. *Curr Protoc Cell Biol*.53:26.14.1-25. doi: 10.1002/0471143030.cb2614s53
  27. King DP, Reid SM, Hutchings GH, Grierson SS, Wilkinson PJ, Dixon LK, et al. Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods*. (2003) 107:53-61. doi: 10.1016/S0166-0934(02)00189-1
  28. Barasona J, Lopez-Olvera J, Beltran-Beck B, Gortazar C, Vicente J. Trap- effectiveness and response to tiletamine-zolazepam and medetomidine anaesthesia in Eurasian wild boar captured with cage and corral traps. *BMC Vet Res*. (2013) 9:107. doi: 10.1186/1746-6148-9-107
  29. Manual of Diagnostic tests and Vaccines for Terrestrial Animals OIE (2012). Available online at: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.08.01\\_ASF.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.01_ASF.pdf)
  30. Rossi S, Staubach C, Blome S, Guberti V, Thulke H-H, Vos A, et al. Controlling of CSFV in European wild boar using oral vaccination: a review. *Front Microbiol*. (2015) 6:1141. doi: 10.3389/fmicb.2015.01141
  31. Krug PW, Holinka LG, O'Donnell V, Reese B, Sanford B, Fernandez-Sainz I, et al. 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*. (2015) 89:2324-32. doi: 10.1128/JVI.03250-14
  32. O'Donnell V, Holinka LG, Gladue DP, Sanford B, Krug PW, Lu X, et al. African swine fever virus georgia isolate harboring deletions of MGF360 and MGF505 genes is attenuated in swine and confers protection against challenge with virulent parental virus. *J Virol*. (2015) 89:6048-56. doi: 10.1128/JVI.00554-15
  33. O'Donnell V, Holinka LG, Krug PW, Gladue DP, Carlson J, Sanford B, et al. African swine fever Virus Georgia 2007 with a deletion of virulence-associated gene 9GL (B119L), when administered at low doses, leads to virus attenuation in swine and induces an effective protection against homologous challenge. *J Virol*. (2015) 89:8556-66. doi: 10.1128/JVI.00969-15
  34. O'Donnell V, Risatti GR, Holinka LG, Krug P, Carlson J, Velazquez- Salinas L, et al. Simultaneous deletion of the 9GL and UK genes from the African swine fever virus Georgia 2007 isolate offers increased safety and protection against homologous challenge. *J Virol*. (2016) 91:e01760-doi: 10.1128/JVI.01760-16
  35. Allaway EC, Chinombo DO, Edelsten RM, Hutchings GH, Sumption KJ. Serological study of pigs for antibody against African swine fever virus in two areas of southern Malawi. *Rev Sci Tech*. (1995) 14:667- 76. doi: 10.20506/rst. 14.3.864
  36. Sanchez-Vizcaino JM, Mur L, Martinez-López B. African swine fever: an epidemiological update. *Transbound Emerg Dis*. (2012) 59:27-35. doi: 10.1111/j. 1865-1682.2011.01293.x
  37. Nurmoja I, Petrov A, Breidenstein C, Zani L, Forth JH, Beer M, et al. Biological characterization of African swine fever virus genotype II strains from north-eastern Estonia in European wild boar. *Transbound Emerg Dis*. (2017) 64:2034-41. doi: 10.1111/tbed. 12614
  38. Petrov A, Forth JH, Zani L, Beer M, Blome S. No evidence for long-term carrier status of pigs after African swine fever virus infection. *Transbound Emerg Dis*. (2018) 65:1318-28. doi: 10.1111/tbed. 12881
  39. Revilla Y, Pérez-Nú- ez D, Richt JA. African swine fever virus biology and vaccine approaches. *Adv Virus Res*. (2018) 100:41- 74. doi: 10.1016/bs.aivir.2017.10.002
  40. Mulumba-Mfumum LK, Goatley LC, Saegerman C, Takamatsu HH, Dixon LK. Immunization of African indigenous pigs with attenuated genotype I African swine fever virus OURT88/3 induces protection against challenge with virulent strains of genotype I. *Transbound Emerg Dis*. (2016) 63:e323-doi: 10.1111/tbed. 12303
  41. Schulz K, Olsevskis E, Staubach C, Lamberg K, Servants M, Cvetkova S, et al. Epidemiological evaluation of Latvian control measures for African swine fever in wild boar on the basis of surveillance data. *Set Rep*. (2019) 9:4189. doi: 10.1038/s41598-019-40962-3

***Biên dịch: Nguyễn Bá Hiền – Nguyễn Thị Hồng Hạnh - Học viện Nông nghiệp Việt Nam***