

# Nâng cao - tham khảo

## PHÁT TRIỂN VACCIN DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI HIỆU LỰC CAO BẰNG PHƯƠNG PHÁP XÓA GEN I177L TẠO KHẢ NĂNG MIỄN DỊCH HOÀN TOÀN VỚI CHỦNG ĐANG GÂY DỊCH Ở LỤC ĐỊA Á-ÂU

*Manuel V. Borca<sup>a</sup>, Elizabeth Ramirez-Medina<sup>a,b</sup>, Ediane Silva<sup>a,c</sup>, Elizabeth Vuono<sup>a,d</sup>, Ayushi Rai<sup>a,e</sup>, Sarah Pruitt<sup>a,e</sup>, Lauren G. Holinka<sup>a</sup>, Lauro Velazquez-Salinas<sup>a,c</sup>, James Zhu<sup>a</sup> and Douglas P. Gladue<sup>a</sup>*

*J Virol.* 2020 Apr; 94(7): e02017-19

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dịch tả lợn châu Phi (ASF) là bệnh truyền nhiễm do virus và thường gây chết ở lợn. Căn nguyên gây bệnh, virus ASF (ASFV) là loại virus DNA kép (dsDNA) có vỏ lớn, kích thước khoảng 190 kbp (1). ASFV có sự tương đồng về cấu trúc gen và chiến lược nhân lên với các loại virus dsDNA lớn khác, bao gồm cả *Poxviridae*, *Iridoviridae* và *Phycodnaviridae* (2). Tuy nhiên, ở cấp độ protein hoặc amino acid, nó có rất ít sự tương đồng với phần lớn virus protein và rất ít protein của ASFV được đánh giá về chức năng hoặc về sự đóng góp của chúng đối với sinh bệnh học của virus.

Hiện nay, ASF là bệnh đặc hữu ở hơn 20 quốc gia châu Phi vùng hạ Sahara. Ở châu Âu, ASF có mặt trên đảo Sardinia (Ý), và bùng phát ở các quốc gia khác bắt đầu với vụ dịch bùng phát ở vùng Kavkaz vào năm 2007, ảnh hưởng đến Georgia, Armenia, Azerbaijan và Nga. ASF tiếp tục lây lan không kiểm soát trên khắp châu Á-châu Âu với các đợt bùng phát xảy ra trong năm 2018 đến 2019 tại Trung Quốc, Mông Cổ, Việt Nam, Lào, Campuchia, Serbia, Myanmar, Bắc Triều Tiên và Philippines. ASF cũng đã lây lan sang lợn rừng ở Bỉ nhưng đã bị khống chế và cách ly ngay kể từ lần đầu tiên căn bệnh này xuất hiện vào năm 2018. Trình tự gen của một số ASFV mới được phát hiện có sự tương đồng nucleotide cao, chỉ có những thay đổi nhỏ so với chủng bùng phát ban đầu năm 2007, ASFV Georgia 2007/1, một chủng có độc lực cao thuộc nhóm ASFV genotype II (3).

Chưa có vaccin ASF, các ổ dịch hiện đang được kiểm soát bởi kiểm dịch và giết hủy động vật. nỗ lực tiêm phòng cho động vật bằng cách sử dụng dịch chiết tách từ tế bào bị nhiễm bệnh, dịch nổi của bạch cầu máu ngoại vi lợn bị nhiễm bệnh, virions tinh khiết và bất hoạt, đại thực bào cố định glutaraldehyde bị nhiễm bệnh hoặc đại thực bào bị nhiễm bệnh được xử lý bằng chất tẩy rửa không tạo ra được khả năng miễn dịch bảo vệ (4-7). Lợn sống sót sau nhiễm virus có khả năng sinh miễn dịch kháng lại các chủng ASFV gây bệnh vừa phải hoặc đã bị suy giảm độc lực, có khả năng kháng lâu dài với các virus tương tự, nhưng hiếm khi với các biến chủng của virus (8, 9). Đáng chú ý là lợn được tiêm chủng bằng ASFV sống giảm độc lực bằng cách xóa đoạn gen quy định độc lực của virus, được bảo vệ khi công cường độ bằng chủng virus còn nguyên độc lực ban đầu (10-15). Những kết quả này tạo ra bằng chứng thực nghiệm minh chứng cho việc phát triển một loại vaccin sống giảm độc lực có hiệu quả chống lại ASFV là hoàn toàn hợp lý.

Trong bài báo này, chúng tôi công bố khám phá rằng việc xóa gen I177L ở chủng độc lực cao ASFV Georgia (ASFV-G) dẫn đến giảm độc lực hoàn toàn trên lợn. Lợn được gây nhiễm với virus đã xóa đoạn gen I177L, ASFV-G-ΔI177L, biểu hiện lâm sàng bình thường và có đáp ứng kháng thể đặc hiệu với virus cao, và quan trọng là lợn đã nhiễm ASFV-G-ΔI177L được bảo vệ hoàn toàn khi công cường độ bằng chủng virus độc lực cao ban đầu, ASFV-G.

## II. KẾT QUẢ

### Bảo toàn gen I177L qua các chủng ASFV khác nhau

Khung đọc mở ASFV-G (ORF) I177L mã hóa protein gồm 177 amino acid và nằm trên sợi ngược, giữa các vị trí nucleotide 174471 và 175004 của hệ gen ASFV-G (hình 1). Mức độ bảo toàn I177L giữa các chủng ASFV đã được kiểm tra bằng cách căn chỉnh lè/so sánh nhiều trình tự bằng phần mềm CLC Genomics Workbench (CLC bio, Aarhus, Denmark). Các trình tự protein ASFV I177L được sử dụng có nguồn gốc từ tất cả các trình tự của các chủng ASFV đại diện cho các chủng châu Phi, châu Âu và Caribe từ lợn nhà, lợn hoang dã và ve. I177L có chiều dài protein ước tính từ 161 đến 177 amino acid tùy theo từng chủng. Hầu hết các chủng có chứa protein có chiều dài 177 amino acid, với một vài chủng biểu hiện một điểm cuối C bị cắt cụt hình thành protein có

từ 161 đến 162 amino acid. Người ta dự đoán rằng I177L có thể chứa một xoắn ốc xuyên màng N (dữ liệu không được hiển thị). I177L đôi khi được hiển thị trong các chủng gần đây bằng cách sử dụng một bộ ba mã hóa khởi động khác xảy ra ở vị trí 112; tuy nhiên, đây đã được chứng minh là một trình tự lỗi trong hiển thị của các bộ gen này (16). Ở cấp độ amino acid, I177L cho thấy mức độ khác biệt amino acid rất cao giữa các chủng, có chứa các dạng I177L giống hoặc khác nhau được so sánh (hình 1). Cần lưu ý rằng gen I177L của ASFV-G giống hệt với gen của chủng virus gần đây mới được phân lập từ Bỉ và Estonia (Số lưu trữ GenBank LR536725.1 và LS478113.1). Ngoài ra, trình tự gen I177L của chủng ASFV Benin giống hệt với trình tự gen của các chủng từ Ý, OURT, NHV, L60 và E75, và gen của chủng BA71V giống hệt với chủng từ Kenya và Uganda (Mã số trên GenBank AM712240.1, KM262846, FN557520.1, NC 001659.2, AY261360 và MH025917.1).



Hình 1. So sánh sự tương đồng (Multiple-sequences alignment)/Căn chỉnh lè các trình tự protein I177L của các chủng ASFV được chọn, với mức độ tương đồng được biểu diễn dưới dạng dấu chấm và khoảng trống trong chuỗi được biểu thị bằng dấu gạch ngang. Mức độ bảo tồn giữa các chuỗi được thể hiện bên dưới các chuỗi.

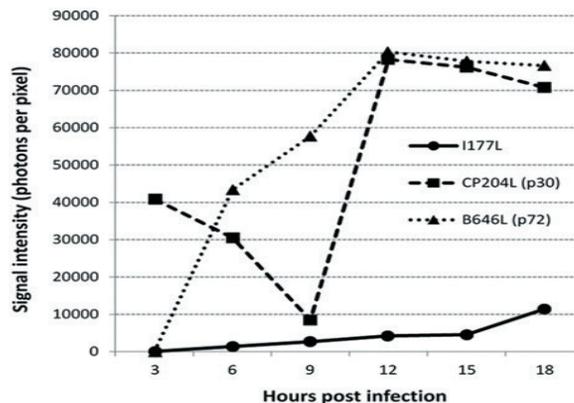
Gen I177L được phiên mã như một gen muộn trong chu kỳ nhân lên của virus. Thời gian phiên

mã gen I177L được xác định bằng microarray đánh giá RNA tổng số được chiết tách từ tế bào đại thực

bào lợn nguyên phát bị nhiễm ASFV-G nuôi cấy ở 3, 6, 9, 12, 15 và 18 giờ sau gây nhiễm (hpi) (thể hiện cho khoảng một vòng đời nhân lên của ASFV).

Hình 2 cho thấy cường độ tín hiệu microarray của ba khung đọc mở ASFV tại sáu thời điểm lấy mẫu. Gen CP204L (mã hóa protein p30 của ASFV) được biểu hiện ở khoảng 41.000 photon cho mỗi pixel ở 3 hpi, phù hợp với biểu hiện gen sớm đã biết sau khi nhiễm ASFV. Biểu hiện giảm dần ở mức 6 và 9 hpi và sau đó tăng đáng kể (hơn 9 lần), đạt mức cao nhất ở 12 hpi. Ngược lại, B646L - một gen protein vỏ virus, p72, được biết đến với biểu

hiện muộn, thực tế không được biểu hiện ở mức 3 hpi, mà ở mức <20 photon mỗi pixel. Tín hiệu biểu hiện p72 tăng đáng kể lên >44.000 ở 6 hpi và đạt mức cao nhất ở 12 hpi. I177L dường như là một gen biểu hiện muộn, giống như B646L. Gen I177L được phiên mã ở mức dưới 50 photon trên mỗi pixel ở mức 3 hpi. Không giống như gen p72, biểu hiện I177L tăng tuyến tính với tốc độ thấp hơn nhiều, và biểu hiện của nó vẫn thấp ở mức 18 hpi. Không biểu hiện nào được quan sát thấy đối với bất kỳ gen được xác định nào trong các mẫu đối chứng âm được lấy tại các thời điểm nghiên cứu.



Hình 2. Thời gian diễn ra phiên mã gen I177L. Biểu hiện cường độ tín hiệu microarray trung bình (photon trên mỗi pixel) của khung đọc mở ARN ASFV I177L, CP204L và B646L được chuẩn bị từ các đại thực bào lợn đã gây nhiễm ASFV ở thời điểm 3, 6, 9, 12, 15 và 18 h sau gây nhiễm.

Tạo đột biến xóa gen I177L của chủng ASFV-Georgia. Để xác định vai trò của I177L trong quá trình nhiễm ASFV trong nuôi cấy tế bào và độc lực ở lợn, một loại virus tái tổ hợp thiếu gen I177L đã được thiết kế (ASFV-G- $\Delta$ I177L). ASFV-G- $\Delta$ I177L được tạo ra từ ASFV Georgia 2010 (ASFV-G) có khả năng gây bệnh cao được phân lập bằng các quy trình tái tổ hợp tương đồng như được mô tả trong phần Vật liệu và phương pháp. Gen I177L đã được thay thế bằng một đoạn gen có chứa huỳnh quang mCherry dưới dạng chất hoạt hóa p72 của ASFV (hình 3). Virus tái tổ hợp đã được chọn sau 10 vòng pha loãng, thanh lọc hạn chế dựa trên hoạt động huỳnh quang. Quần thể virusthu được từ vòng thanh lọc cuối cùng đã được nhân lên trong nuôi cấy tế bào đại thực bào lợn nguyên thủy để có được nguồn dự trữ virus.

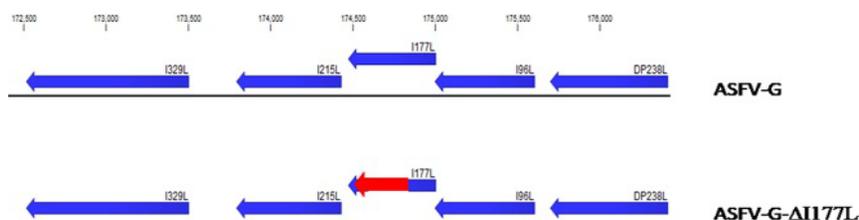
Sơ đồ biểu hiện vị trí của khung đọc mở I177L

trong bộ gen ASFV-G (bên trên). Một plasmid mang, tương đồng với ASFV-G và mCherry dưới sự kiểm soát của chất hoạt hóa p72, đã được sử dụng để tạo ra những biến đổi gen (bên dưới) để tạo ra ASFV-Georgia- $\Delta$ I177L, trong đó trình tự biểu hiện của plasmid mang mCherry (màu đỏ) được đưa vào để thay thế ORF của I177L, như đã nêu.

Để đánh giá chính xác sự thay đổi di truyền học, tính toàn vẹn của bộ gen và độ tinh khiết của virus tái tổ hợp thu được, chúng tôi đã tiến hành giải trình tự toàn bộ gen của ASFV-G- $\Delta$ I177L và ASFV-G ban đầu bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) để so sánh. Các cụm trình tự DNA của ASFV-G- $\Delta$ I177L và ASFV-G cho thấy 112 nucleotide của gen I177L đã bị xóa (giữa các vị trí nucleotide 174530 và 174671) phù hợp với biến đổi đã nêu. Trình tự gen tương ứng của ASFV-G- $\Delta$ I177L cho

thấy 3.944 nucleotide, tương ứng với trình tự đoạn gen *p72mCherryΔI177L*, được chèn vào trong quá trình xóa 112 nucleotide của gen *I177L*. Bên cạnh

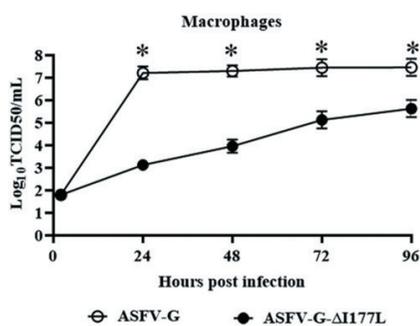
những thay đổi được thiết kế, không có thêm đột biến không mong muốn nào được phát hiện trong phần còn lại của bộ gen ASFV-G-ΔI177L.



Hình 3. Sơ đồ biểu hiện vị trí của khung đọc mở *I177L* trong bộ gen ASFV-G (bên trên). Một plasmid mang, tương đồng với ASFV-G và *mCherry* dưới sự kiểm soát của chất hoạt hóa *p72*, đã được sử dụng để tạo ra những biến đổi gen (bên dưới) để tạo ra ASFV-Georgia-ΔI177L, trong đó trình tự biểu hiện của plasmid mang *mCherry* (màu đỏ) được đưa vào để thay thế ORF của *I177L* như đã nêu.

Sự nhân lên của ASFV-G-ΔI177L trong đại thực bào nguyên thủy lợn. Đặc tính tăng trưởng *in vitro* của ASFV-G-ΔI177L đã được đánh giá trong nuôi cấy tế bào đại thực bào lợn nguyên thủy, tế bào nguyên thủy được ASFV nhắm tới trong quá trình nhiễm bệnh ở lợn được so sánh với tế bào gắn ASFV-G ban đầu bằng các đường cong tăng trưởng ở nhiều bước (hình 4). Tế bào nuôi cấy bị nhiễm bệnh với hệ số nhiễm trùng (MOI) là 0,01 và các mẫu được lấy ở 2, 24, 48,

72 và 96 hpi. Kết quả đã chứng minh rằng biến động tăng trưởng của ASFV-G-ΔI177L giảm so với biến động tăng trưởng của ASFV-G ban đầu. Hàm lượng ASFV-G-ΔI177L thấp hơn khoảng 100 đến 1.000 lần so với ASFV-G, tùy thuộc vào thời điểm kiểm tra. Do đó, việc xóa gen *I177L* làm giảm khả năng nhân bản *in vitro* trong nuôi cấy tế bào đại thực bào lợn nguyên thủy của ASFV-G-ΔI177L, so với chủng ASFV-G ban đầu.



Hình 4. Đặc điểm tăng trưởng *in vitro* của ASFV-Georgia-ΔI177L và ASFV-G ban đầu. Đại thực bào lợn nguyên thủy được nuôi cấy đã bị nhiễm (0,01 MOI) với mỗi loại virus và hàm lượng virus được chuẩn độ vào thời điểm được xác định sau khi nhiễm bệnh. Dữ liệu thể hiện kết quả trung bình từ ba thí nghiệm độc lập. Độ nhạy phát hiện virus  $\geq 1,8 \log_{10} \text{HAD}_{50} / \text{ml}$ . Sự sai khác đáng kể (\*) về hàm lượng virus giữa hai loại virus tại các thời điểm cụ thể được xác định bằng phương pháp Holm-Sidak ( $\alpha = 0,05$ ), mà không giả định độ lệch chuẩn nhất quán. Dữ liệu được tính toán bằng phần mềm GraphPad Prism phiên bản 8. TCID<sub>50</sub> liều lây nhiễm 50% tế bào nuôi cấy.

Đánh giá độc lực của ASFV-G-ΔI177L ở lợn. Để đánh giá mức độ giảm độc lực đạt được bởi ASFV-G-ΔI177L, một thí nghiệm sơ bộ đã được thực hiện sử dụng tải lượng virus thấp. Một nhóm lợn nặng từ 80 đến 90 pound đã được gây nhiễm qua tiêm bắp (i.m.) với liều  $10^2 \text{HAD}_{50}$  (liều hấp

phụ 50% hồng cầu) ASFV-G-ΔI177L và so sánh với động vật được tiêm với  $10^2 \text{HAD}$  ASFV-G ban đầu. Cả năm con vật được tiêm ASFV-G đều tăng thân nhiệt ( $>40^\circ\text{C}$ ) vào ngày thứ 5 sau khi nhiễm, có các biểu hiện lâm sàng liên quan đến bệnh, bao gồm biếng ăn, trầm cảm, da tím nhạt, đáng đi

loang choạng và tiêu chảy (bảng 1). Các dấu hiệu của bệnh dần trở nên trầm trọng hơn theo thời gian và con vật hoặc bị chết hoặc được giết hủy sau 7 ngày gây nhiễm (pi). Ngược lại, năm con vật được

tiêm i.m. với ASFV-G-ΔI177L không có bất kỳ dấu hiệu nào liên quan đến ASF, vẫn bình thường về mặt lâm sàng trong toàn bộ thời gian quan sát (28 ngày).

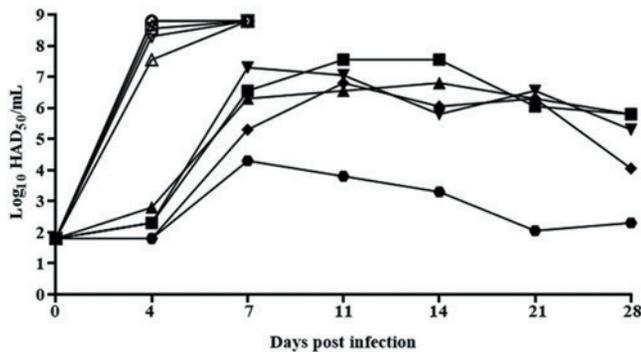
**Bảng 1. Lợn còn sống và biểu hiện sốt sau khi gây nhiễm với liều  $10^2$  HAD<sub>50</sub> ASFV-G-ΔI177L hoặc ASFV-G ban đầu**

Virus	Số con còn sống (n = 5)	Thời gian chết (mean [SD]) (ngày)	Dữ liệu về sốt (mean [SD])		
			Số ngày sau tiêm	Thời gian (ngày)	Thân nhiệt hàng ngày tối đa (°C)
ASFV-G	0	7 (0) <sup>a</sup>	5 (0)	1 (0)	41,2 (0,77)
ASFV-G-ΔI177L	5				39,2 (0,31)

<sup>a</sup> Tất cả lợn thí nghiệm đã được giết hủy vì lý do nhân đạo, theo giao thức IACUC.

Hiệu giá virus ở lợn đã gây nhiễm ASFV-G cao như dự kiến ( $10^{7.5}$  đến  $10^{8.5}$  HAD<sub>50</sub>/ml) vào ngày thứ 4 sau gây nhiễm, tiếp tục tăng lên (khoảng  $10^{8.5}$  HAD<sub>50</sub>/ml) ở ngày thứ 7 sau gây nhiễm, khi tất cả các lợn thí nghiệm được an tử. Trái lại, lợn được gây nhiễm ASFV-G-ΔI177L thể hiện một kiểu phản ứng khác, với hiệu giá virus trong máu ( $10^{1.8}$  đến  $10^{2.3}$  HAD<sub>50</sub>/ml) vào ngày thứ 4 sau gây nhiễm, đạt giá trị cao nhất ( $10^{3.8}$  đến  $10^{7.5}$  HAD<sub>50</sub>/ml) ở ngày thứ 11pi và định lượng giảm ( $10^{2.3}$  đến

$10^4$  HAD<sub>50</sub>/ml) cho đến ngày thứ 28pi (hình 5). Cần lưu ý rằng một trong năm con vật được tiêm ASFV-G-ΔI177L có mức độ virus huyết thấp hơn đáng kể (thấp hơn 1.000 đến 10.000 lần tùy thuộc vào thời điểm quan sát) so với giá trị virus huyết trung bình của các con khác trong nhóm. Do đó, việc xóa gen *I177L* đã tạo ra sự suy giảm hoàn toàn độc lực của virus ASFV-G ban đầu khi được tiêm ở liều thấp, với những con gây nhiễm có giá trị virus huyết luôn ở mức tương đối thấp.



Hình 5. Hiệu giá virus huyết được phát hiện ở lợn được tiêm tĩnh mạch với  $10^2$  HAD<sub>50</sub> ASFV-Georgia-ΔI177L hoặc  $10^2$  HAD<sub>50</sub> ASFV-G. Mỗi đường cong thể hiện giá trị của từng con thuộc mỗi nhóm. Độ nhạy phát hiện virus huyết là  $\geq 1,8 \log_{10}$  HAD<sub>50</sub>/ml.

Để kiểm tra liệu độc lực có khả năng còn sót lại trong ASFV-G-ΔI177L, thí nghiệm thứ hai đã được thực hiện, trong đó một lô gồm năm con lợn khác được tiêm i.m. liều  $10^2$ ,  $10^4$ , hoặc  $10^6$  HAD<sub>50</sub> ASFV-G-ΔI177L và biểu hiện của chúng được so sánh với các con lợn được tiêm  $10^2$  HAD<sub>50</sub> ASFV-G ban đầu. Ngoài ra, một con lợn khỏe không tiêm được nhốt sống chung trong

mỗi nhóm, để theo dõi xem liệu những con lợn đã được tiêm có bài thải mầm bệnh ra ngoài.

Như trong thí nghiệm ban đầu, động vật được tiêm ASFV-G biểu hiện tất cả các dấu hiệu lâm sàng điển hình của bệnh và được giết hủy vào ngày 7pi (bảng 2). Thật thú vị, tất cả các động vật được tiêm ASFV-G-ΔI177L, kể cả những con

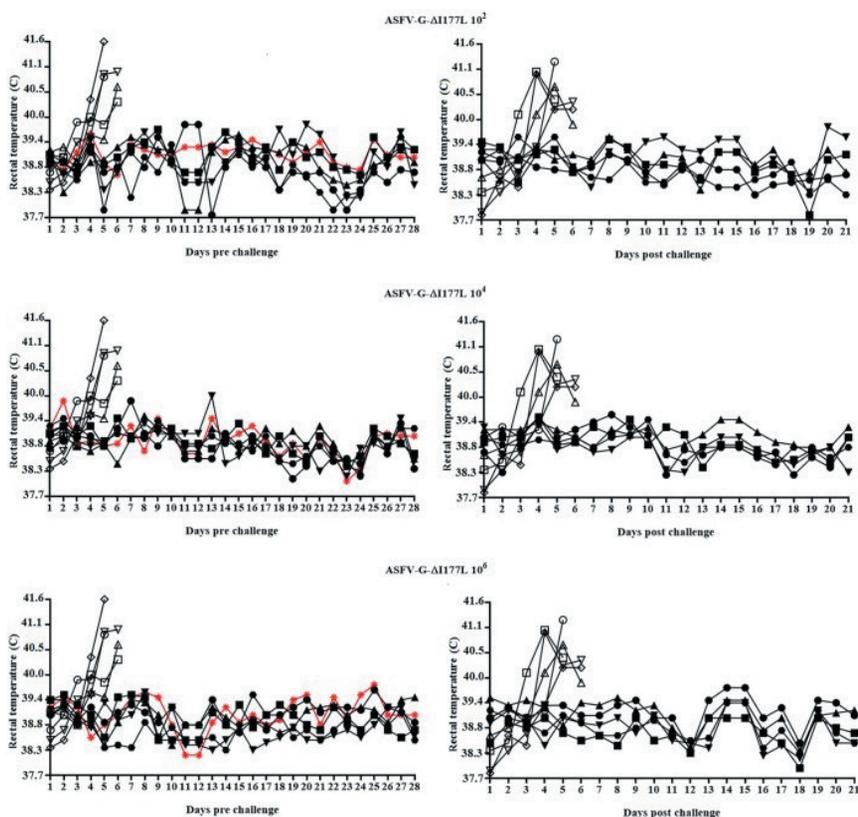
được tiêm liều  $10^6$  HAD<sub>50</sub> đã không có bất kỳ dấu hiệu nào liên quan đến ASF, vẫn giữ biểu hiện lâm sàng bình thường trong suốt thời gian

theo dõi thí nghiệm (28 ngày). Tương tự, tất cả các động vật khỏe nhất chung vẫn bình thường về mặt lâm sàng (hình 6).

**Bảng 2. Lợn còn sống và phản ứng sốt sau khi gây nhiễm với các liều ASFV-G-ΔI177L hoặc ASFV-G khác nhau**

Virus	Số lợn còn sống (n = 5)	Thời gian chết (mean [SD]) (ngày)	Thông tin về sốt (mean [SD])		
			Số ngày sau tiêm	Khoảng thời gian (ngày)	Thân nhiệt hàng ngày tối đa (°C)
ASFV-G	0	4,8 (0,84) <sup>a</sup>	4,8 (0,84)	0,8 (0,84)	40,7 (0,33)
ASFV-G-ΔI177L ở HAD <sub>50</sub>					
10 <sup>2</sup>	5				39,4 (0,32)
10 <sup>4</sup>	5				39,3 (0,32)
10 <sup>6</sup>	5				39,3 (0,27)

<sup>a</sup> Tất cả lợn thí nghiệm đã được an tử vì lý do nhân đạo, theo giao thức IACUC



Hình 6. Biến đổi thân nhiệt của lợn được gây nhiễm với liều  $10^2$ ,  $10^4$  hoặc  $10^6$  HAD<sub>50</sub> (ghi chú ở phía trên cặp so sánh) ASFV-Georgia-ΔI177L (biểu tượng được tô màu), lợn cảm nhiễm/đối chứng (thể hiện màu đen), hoặc  $10^2$  HAD<sub>50</sub> ASFV-G (biểu tượng không được tô màu) (bên trái) và sau khi công cường độc với liều  $10^2$  HAD<sub>50</sub> ASFV-G (bên phải). Mỗi đường cong thể hiện các giá trị của lợn thí nghiệm riêng trong mỗi nhóm. Dữ liệu về động vật cảm nhiễm được thể hiện bằng màu đỏ.

Hiệu giá virus huyết ở động vật nhiễm ASFV-G có sự dao động cao ( $10^{3.5}$  đến  $10^8$  HAD<sub>50</sub>/ml) vào ngày

thứ 4 pi, tăng lên (khoảng  $10^{7.5}$  HAD<sub>50</sub>/ml) vào ngày thứ 7 pi, khi tất cả các động vật được giết hủy (hình

7). Động vật được gây nhiễm  $10^2$  HAD<sub>50</sub>/ml ASFV-G-ΔI177L cho kết quả tương tự như những kết quả được thấy trong thí nghiệm trước đó, mặc dù lần này virus trong máu không được phát hiện cho đến ngày 11 pi (ngoại trừ một con lợn thí nghiệm), và hai trong số năm con vật thể hiện hàm lượng virus thấp hơn rõ ràng so với ba con vật khác trong nhóm. Ở nhóm lợn thí nghiệm được gây nhiễm liều  $10^4$  hoặc  $10^6$  HAD<sub>50</sub>/ml ASFV-G-ΔI177L, virus huyết được phát hiện rõ ràng 4 ngày pi, với giá trị trung bình cao hơn đáng kể (1.000 đến 10.000 lần) so với giá trị này ở những con cùng nhóm được gây nhiễm liều  $10^2$  HAD<sub>50</sub>/ml, đặc biệt ở 4 và 7 ngày pi. Sự khác biệt về hiệu giá virus cũng được thể hiện rõ trong nhóm lợn thí nghiệm được gây bệnh ở liều ASFV-G-ΔI177L cao hơn, đặc biệt ở 21 và 28 ngày pi, khi mà 3 con lợn được tiêm của mỗi nhóm có hàm lượng virus huyết thấp hơn đáng kể so với hàm lượng này ở 3 con lợn còn lại trong nhóm. Vì vậy, xóa gen I177L đã gây ra sự giảm hoàn toàn độc lực cao của virus ASFV-G ban đầu ngay cả khi sử dụng ở liều cao, với những con lợn đã được gây nhiễm có hàm lượng virus huyết thấp mà sống được trong suốt 28 ngày theo dõi thí nghiệm. Đáng chú ý là virus không được phát hiện trong bất kỳ mẫu nào (toàn bộ mẫu máu lấy ở các thời điểm cũng như mẫu hạch và lách

thu được ở ngày thứ 28 pi) thu được từ động vật cảm thụ bệnh (dữ liệu không được thể hiện), chỉ ra rằng lợn được gây nhiễm ASFV-G-ΔI177L đã không thải đủ virus để gây nhiễm lợn sạch bệnh trong suốt 28 ngày nhốt chung.

Hiệu lực bảo vệ của ASFV-G-ΔI177L khi công cường độc bằng ASFV-G ban đầu. Để kiểm tra khả năng bảo vệ ở lợn được tiêm ASFV-G-ΔI177L kháng với virus ASFV-G ban đầu khi công cường độc, toàn bộ lợn được gây nhiễm với ASFV-G-ΔI177L đã được công cường độc ở 28 ngày sau đó với liều  $10^2$  HAD<sub>50</sub> ASFV-G bằng đường tiêm bắp. Năm con lợn khỏe mạnh, sạch bệnh cũng được công cường độc để làm nhóm đối chứng.

Toàn bộ lợn đối chứng bắt đầu có biểu hiện bị bệnh trong ngày 3-4 sau khi được tiêm (dpc), và biểu hiện bệnh tăng dần đến mức nguy kịch trong những giờ sau đó; những lợn này đã được giết hủy khoảng 5 ngày sau tiêm (bảng 3). Trái lại, ba nhóm lợn được gây nhiễm với ASFV-G-ΔI177L vẫn có biểu hiện sức khỏe bình thường, không có bất kỳ dấu hiệu đặc trưng của bệnh trong suốt 21 ngày theo dõi. Như vậy, lợn được gây nhiễm với ASFV-G-ΔI177L được bảo vệ khỏi virus độc lực cao ban đầu khi công cường độc.

**Bảng 3. Lợn được gây nhiễm ASFV-G-ΔI177L còn sống và phản ứng sốt khi được công cường độc bằng ASFV-G ở 28 ngày sau**

Virus	Số lợn còn sống/tổng số lợn thí nghiệm	Thời gian chết (mean[SD]) (ngày)	Dữ liệu về sốt (mean [SD])		
			Số ngày sau tiêm	Khoảng thời gian (ngày)	Thân nhiệt hàng ngày tối đa (°C)
Đối chứng	0/5	5,6 (0,55) <sup>a</sup>	4,2 (0,84)	1,4 (0,88)	40,9 (0,43)
ASFV-G-ΔI177L ở HAD <sub>50</sub> :					
10 <sup>2</sup>	10/10				39,3 (0,38)
10 <sup>4</sup>	5/5				39,4 (0,21)
10 <sup>6</sup>	5/5				39,4 (0,24)

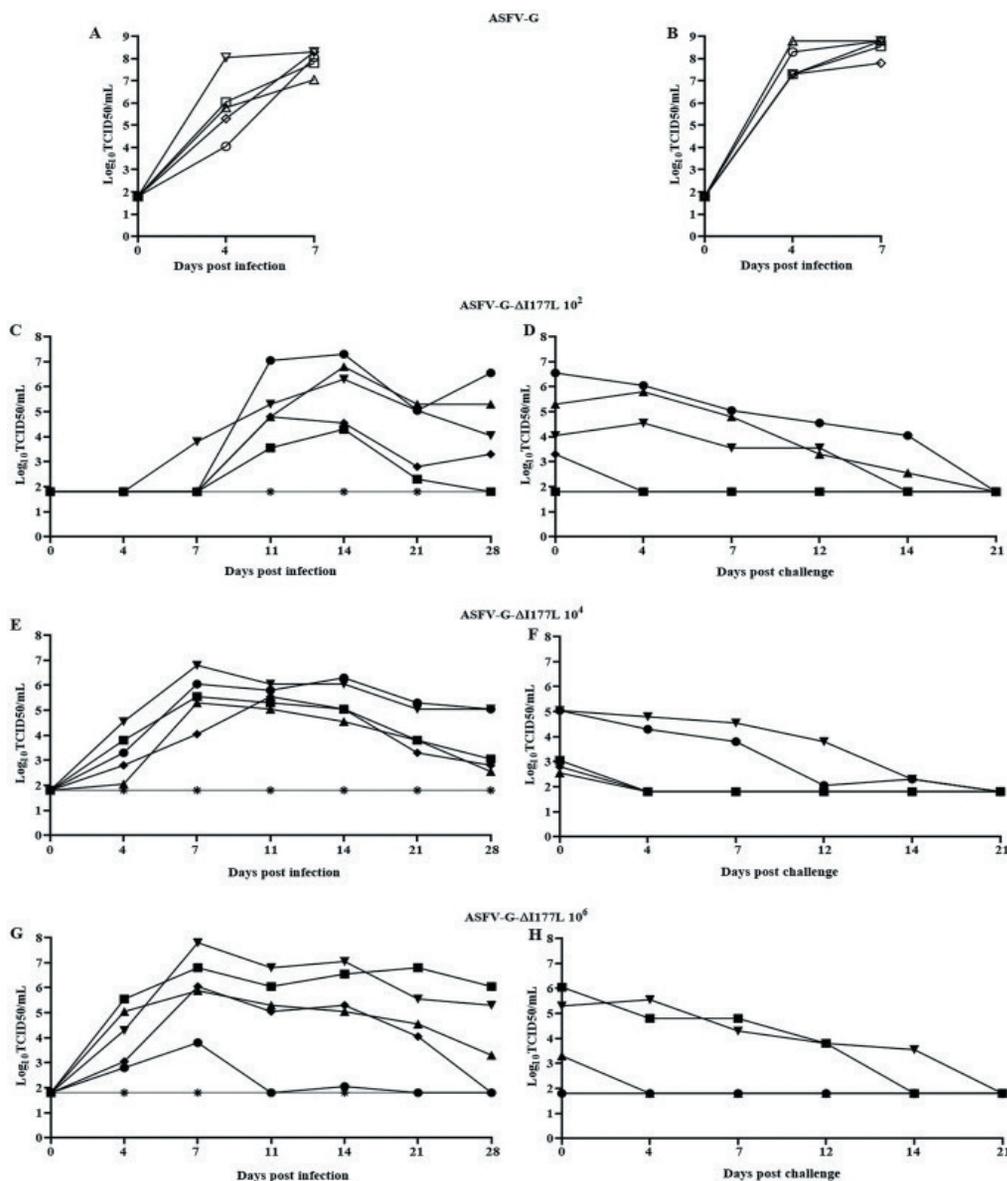
<sup>a</sup>Tất cả lợn thí nghiệm đã được an tử vì lý do nhân đạo, theo giao thức IACUC.

Hàm lượng virus huyết ở những lợn được gây nhiễm với ASFV-G là cao ( $10^{7,3}$  đến  $10^{8,3}$  HAD<sub>50</sub>/ml) ở ngày thứ 4pi, tăng lên (trung bình  $10^{8,5}$  HAD<sub>50</sub>/ml) ở ngày thứ 7pi, khi lợn được giết hủy. Sau công cường độc, không lợn nào đã được gây nhiễm với ASFV-G-ΔI177L có hàm lượng virus huyết cao hơn hàm lượng này ở thời điểm thử thách, và hàm lượng virus huyết giảm dần cho

đến khi kết thúc thử nghiệm (21 ngày sau khi thử thách) và quan trọng hơn, không phát hiện thấy virus lưu hành trong máu của những con lợn này (hình 7). Đáng chú ý, hàm lượng virus huyết sau khi công cường độc được xác định bằng phản ứng hấp phụ hồng cầu (HA), và phương pháp huỳnh quang là hoàn toàn trùng khớp với nhau, đều cho thấy rằng không có hoặc có rất ít virus được tiêm

vào nhân lên. Để kiểm tra khả năng nhân lên của virus dùng để công cường độc, chúng tôi đã kiểm tra sự có mặt của ASFV-G trong các mẫu máu được lấy ở ngày thứ tư sau công, khi hàm lượng virus huyết đạt cao nhất sau khi thử thách (hình

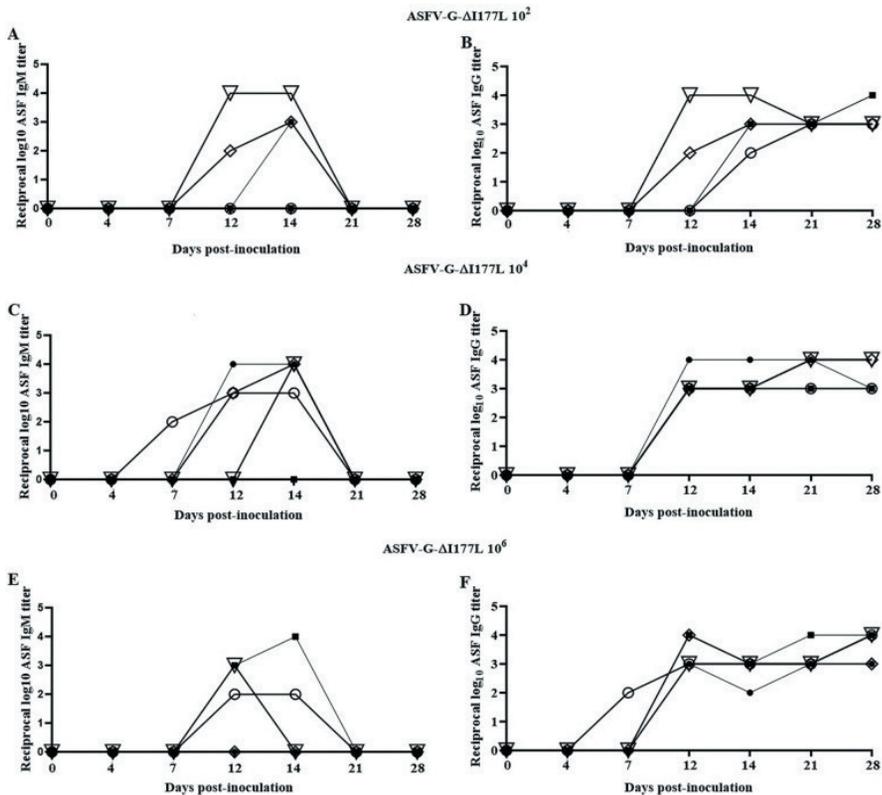
7). Realtime-PCR đặc hiệu I177L được sử dụng nhằm phát hiện chỉ virus dùng để công cường độc (với độ nhạy ở khoảng  $10 \text{ HAD}_{50}$ ), tất cả các mẫu máu lợn được kiểm tra là âm tính, loại trừ 1 mẫu của lợn được gây nhiễm với  $10^2 \text{ HAD}_{50}$  ASFV-G-



Hình 7. Hiệu giá virus huyết được phát hiện trong lợn được gây nhiễm với ASFV-Georgia- $\Delta$ I177L hoặc ASFV-G qua đường tiêm bắp (từ A đến H). Lợn được gây nhiễm với liều  $10^2 \text{ HAD}_{50}$  ASFV-G (A và B) hoặc ASFV-Georgia- $\Delta$ I177L ở liều  $10^2$  (C và D),  $10^4$  (E và F), hoặc  $10^6$  (G và H)  $\text{HAD}_{50}$  (C đến H). Virus huyết ở những con lợn được gây nhiễm ASFV-Georgia- $\Delta$ I177L trước (C, E và G) hoặc sau (D, F và H) công cường độc với liều  $10^2 \text{ HAD}_{50}$  ASFV-G. Mỗi đường cong biểu hiện giá trị của từng lợn thí nghiệm trong mỗi nhóm. Độ nhạy phát hiện virus là  $\geq 1,8 \log_{10} \text{HAD}_{50}/\text{ml}$ . Số liệu thu được từ các lợn cảm nhiễm được thể hiện bằng màu đỏ.

$\Delta I177L$  (dữ liệu không được biểu hiện). Hơn nữa, mẫu hạch và lách của các lợn được gây nhiễm với ASFV-G- $\Delta I177L$  đã được lấy và kiểm tra sự có mặt của virus ở thời điểm kết thúc theo dõi thí nghiệm (21 ngày sau công cường độc). Hầu hết các lợn ở mỗi nhóm đều có nhiễm virus ở hạch hoặc lách (số liệu không được thể hiện). Tất cả các mẫu dương tính này, sau đó đã được kiểm tra bằng realtime-PCR đặc hiệu I177L, phát hiện virus công cường độc ở duy nhất một mẫu lách được lấy từ lợn đã được gây nhiễm với  $10^2$  HAD<sub>50</sub>/ml ASFV-G- $\Delta I177L$ , con lợn này cũng được phát hiện có virus công cường độc trong máu (số liệu không được thể hiện). Các kết quả thu được này chỉ ra rằng không có sự nhân lên của virus dùng để thử thách ở tất cả các lợn thí nghiệm được gây nhiễm với  $10^4$  HAD<sub>50</sub>/ml hoặc cao hơn và ở hầu hết các lợn đã được gây nhiễm với  $10^2$  HAD<sub>50</sub>/ml ASFV-G- $\Delta I177L$ .

Khả năng đáp ứng kháng thể ở những con lợn được gây nhiễm với ASFV-G- $\Delta I177L$ . Cơ chế sinh miễn dịch trung gian của vật chủ để chống lại độc lực của ASFV ở những con lợn được gây nhiễm với chủng virus đã giảm độc lực vẫn chưa được xác định rõ ràng (17-19). Theo kinh nghiệm đã có của nhóm nghiên cứu thì chỉ có một yếu tố duy nhất liên quan mật thiết đến việc bảo vệ khi công cường độc đó là sự xuất hiện của kháng thể (20). Để có những hiểu biết thêm về cơ chế miễn dịch ở những con lợn được gây nhiễm với ASFV-G- $\Delta I177L$ , chúng tôi đã thử xem sự kháng bệnh này liệu có tương quan với sự xuất hiện kháng thể kháng ASFV. Đáp ứng kháng thể đặc hiệu ASFV đã được phát hiện trong huyết thanh của những con lợn này bằng hai ELISA trực tiếp, phương pháp nội bộ (20). Tất cả những lợn được gây nhiễm ASFV-G- $\Delta I177L$ , không phân biệt liệu virus đã tiếp nhận, đều có hàm lượng kháng thể kháng ASFV lưu hành cao (hình 8). Đáp ứng miễn dịch kháng thể trung gian



Hình 8. Kháng thể kháng ASFV (dạng IgM [A, C, và E] và dạng IgG [B, D và F]) hàm lượng được xác định ELISA ở lợn được tiêm bắp với liều  $10^2$ ,  $10^4$ , hoặc  $10^6$  HAD<sub>50</sub> ASFV-Georgia- $\Delta I177L$ . Mỗi đường cong biểu thị giá trị của các cá thể lợn thuộc mỗi nhóm.

IgM và IgG đã được tìm thấy ở cả ba nhóm ở ngày thứ 12 sau gây nhiễm. Ở ngày thứ 14 sau gây nhiễm, đáp ứng miễn dịch kháng thể trung gian bởi cả hai loại đều đạt mức tối đa ở tất cả các nhóm. Đáp ứng kháng thể qua trung gian IgM biến mất ở các lợn theo dõi vào ngày thứ 21 pi, trong khi đáp ứng miễn dịch qua IgG vẫn được duy trì ở mức cao với sự biến động thấp nhất cho đến ngày thứ 28 pi mà không có sự khác biệt đáng kể nào giữa các cá thể lợn thuộc 3 nhóm đã được gây nhiễm với ASFV-G-ΔI177L. Vì thế, như đã mô tả trong các báo cáo trước đây của chúng tôi (14, 20), sự xuất hiện của kháng thể kháng ASFV ở thời điểm công cường độc và sự bảo vệ có sự tương quan gần với nhau. Cũng cần nêu rõ rằng kháng thể đã không được phát hiện trong bất kỳ một mẫu huyết thanh nào lấy từ các lợn cảm nhiễm, kết hợp với các dữ liệu về virus đã chỉ ra rằng các lợn cảm nhiễm đã không hề bị lây nhiễm bệnh từ những con lợn được gây nhiễm ASFV-G-ΔI177L thuộc cả ba nhóm (hình 8).

### III. THẢO LUẬN

Việc sử dụng các chủng virus giảm độc lực hiện đang là cách tiếp cận hợp lý nhất để phát triển một loại vaccin ASF hiệu quả. Tạo các chủng giảm độc lực bằng thao tác di truyền là một phương pháp thay thế hợp lý và có lẽ an toàn hơn, so với việc sử dụng các chủng giảm độc lực tự nhiên. Nhiều chủng giảm độc lực thu được bằng thao tác di truyền bao gồm việc xóa các gen đơn lẻ hoặc một nhóm các gen, đã được chứng minh là có khả năng bảo vệ chống lại virus độc lực ban đầu (10-13, 15, 21, 22). Ở đây, việc xác định một gen ASFV chưa được quan tâm trước đây, I177L như một yếu tố quyết định độc lực di truyền của virus được mô tả. Việc loại bỏ I177L làm giảm hoàn toàn ASFV-G ở lợn, ngay cả khi được sử dụng với liều lượng cao như  $10^6$  HAD<sub>50</sub>. Chỉ có hai sự biến đổi di truyền khác đã được chứng minh là loại bỏ hoàn toàn độc lực của chủng độc lực cao ASFV Georgia, đó là xóa bỏ gen 9GL (đặc biệt có hiệu lực bởi việc xóa bỏ gen của Anh) và xóa một nhóm sáu gen khỏi MGF360 và 530 (12, 13, 22). Sự suy giảm độc lực quan sát được bằng cách xóa gen I177L là một khám phá đáng chú ý vì ASFV-G không bị suy giảm một cách hiệu quả bằng cách xóa bất kỳ gen nào khác mà có liên quan đến sự suy giảm độc lực ở các chủng ASFV khác (13, 23). Kết hợp các kết quả nghiên cứu khác nhau, rõ ràng là nền tảng di truyền tại điểm xóa gen đóng một vai trò quan trọng trong ảnh hưởng của một gen cụ thể đối

với độc lực của virus, ủng hộ cho quan điểm rằng độc lực ASFV có được do hiệu ứng tương tác của một số gen virus khác nhau.

Như đã mô tả trước đó (3) trong bộ gen ASFV-G 2007, gen I177L được hình thành bởi các nucleotide nằm ở vị trí từ 174471 đến 17467, mã hóa một protein gồm 66 amino acid, trong khi ORF liên kề (ASFV-G-ACD\_0176) được hình thành bởi các vị trí từ 174920 đến 175003. Những sửa chữa gần đây sử dụng công nghệ mới (16) đã xác định xóa một A ở vị trí 174954 của hệ gen ban đầu, hình thành sự kết hợp gen ASFV-G-CD\_0176 với gen I177L trong hệ gen được sửa, từ đó tạo ra chỉ một khung đọc mở (khung đọc mở này giống với gen đọc mở ở hệ gen của các virus khác, như được trình bày ở hình 1). Tái tổ hợp plasmid p72mCherryΔI177L đã được thiết kế dựa trên trình tự gốc của ASFV Georgia/2007 (3). Để bổ sung hoàn chỉnh gen I177L, công bố gần đây (29) phân tích hệ phiên mã của ASFV, chi phiên bản rút gọn của I177L, như được chú thích ban đầu (3), được phát hiện là bản sao protein muộn trong khi bản sao có độ dài đầy đủ của I177L không được phát hiện. Chúng tôi khuyến nghị nên chú thích lại gen I177L theo ORF được rút gọn. Trong cả hai trường hợp như đã thiết kế, virus tái tổ hợp ASFV-G-ΔI177L của chúng tôi, theo lý thuyết sẽ chỉ tạo ra sản phẩm 25 amino acid khớp với 18 gốc đầu tiên trong ORF I177L trước khi xảy ra hiện tượng lệch khung cộng với 7 gốc amino acid bổ sung được tạo ra trước một bộ ba kết thúc. ASFV-G-ACD\_0176 ORF chính thức được dự đoán sẽ chỉ tạo ra miền xuyên màng ở đầu gần N của I177L.

Mặc dù những lợn được gây nhiễm ASFV-G-ΔI177L vẫn giữ được trạng thái bình thường, tất cả chúng vẫn mang virus trong máu ở ngày thứ 28 pi, với hàm lượng cao ở một số trường hợp. Hàm lượng virus huyết cao này là đáng lưu tâm, trong khi mà tỷ lệ tăng trưởng của ASFV-G-ΔI177L giảm so với ASFV-G ban đầu trong nuôi cấy tế bào đại thực bào của lợn. Theo kinh nghiệm của chúng tôi, sự có mặt kéo dài của virus trong máu hoặc virus sống dai dẳng không phải là điều hiếm thấy ở những con lợn được gây nhiễm với các chủng ASFV (12, 13, 21). Như đã trình bày trong báo cáo trên, sự giảm độc lực của virus có liên quan đến khả năng bảo vệ trước virus mang độc lực ASFV-G ban đầu khi công. Thật thú vị là không có sự nhiễm virus nào được phát hiện ở bất kỳ lợn cảm nhiễm nào, điều này chỉ ra rằng sự lây truyền

ASFV-G-ΔI177L từ lợn bị nhiễm sang lợn khỏe mạnh không thường xảy ra, đây là đặc tính mong đợi đối với một ứng cử viên cho vacxin sống giảm độc lực. Việc không có sự lây truyền cũng như biểu hiện gen ASFV-G, cùng với sự thiếu vắng của kháng thể đặc hiệu ASFV trong huyết thanh của những con lợn cảm thụ là cơ sở vững chắc cho thấy rằng không có hiện tượng bài thải virus từ những con lợn được gây nhiễm với ASFV-G-ΔI177L sang những con lợn cảm thụ.

Điều quan trọng là những con lợn được gây nhiễm với ASFV-G-ΔI177L đã được bảo vệ hiệu quả khi công cường độc ở ngày 28pi. Với liều thấp tới  $10^2$  HAD<sub>50</sub> ASFV-G-ΔI177L, và ngay cả khi tiếp nhận  $10^6$  HAD<sub>50</sub> ASFV-G-ΔI177L cũng đã không gây ra bất kỳ một dấu hiệu nhiễm bệnh nào (thậm chí chỉ là sự tăng thân nhiệt rất ít), điều này nhấn mạnh sự an toàn của ứng viên vacxin tiềm năng ASFV-G-ΔI177L. Quan trọng nữa là đường như sự nhân lên của virus dùng công cường độc bị hạn chế khá nhiều ở động vật được gây nhiễm ASFV-G-ΔI177L vì virus dùng để công chỉ được phân lập từ một trong những con lợn được gây nhiễm ASFV-G-ΔI177L với liều thấp.

Mặc dù cơ chế miễn dịch qua trung gian của vật chủ kháng lại sự nhiễm ASFV vẫn còn đang được thảo luận (1, 25), khi tìm hiểu các thí nghiệm về các ứng viên vacxin sống giảm độc lực khác nhau, chúng tôi đã thấy được một sự liên quan gần giữa sự xuất hiện kháng thể đặc hiệu kháng virus và khả năng bảo vệ (12, 14, 22, 24). Trong báo cáo này, chúng tôi cũng thấy mối liên quan giữa sự hiện diện của các kháng thể đặc hiệu virus và khả năng bảo vệ. Điều thú vị là bất kể liều ASFV-G-ΔI177L nào được sử dụng, tất cả lợn thí nghiệm đều có hiệu giá kháng thể tương đương nhau tại thời điểm thử thách, cùng cố sự thực là ở liều thấp ASFV-G-ΔI177L cho hiệu quả như liều cao nhất. Đáng chú ý là vào ngày thứ 14 pi, tất cả lợn thí nghiệm đều đạt hiệu giá kháng thể tối đa. Mặc dù trong báo cáo này, thử thách không được thực hiện ở 14 dpi, những dữ liệu thu được này thống nhất với những dữ liệu của các báo cáo đã công bố trước đó chỉ ra rằng động vật được tiêm bằng ứng viên vacxin ASFV-G-Δ9GL/ΔUK có xuất hiện kháng thể lưu hành được bảo vệ chống lại virus thử thách ở 2 tuần sau gây nhiễm (21).

Chúng tôi tin rằng các kết quả được trình bày ở đây chứng minh rằng ASFV-G-ΔI177L có thể được

coi là một ứng cử viên vacxin mạnh để bảo vệ động vật chống lại chủng ASFV Georgia và các chủng phát sinh của nó hiện đang gây dịch bùng phát ở một khu vực địa lý rộng rãi từ Trung Âu đến Trung Quốc và Đông Nam Á. Việc thiếu vắng hoàn toàn độc lực, ngay cả khi được sử dụng ở liều cao, mức độ truyền nhiễm cho động vật cảm thụ rõ ràng là thấp và hiệu quả cao trong việc bảo vệ ngay cả ở liều lượng thấp làm cho ASFV-G-ΔI177L trở thành một ứng cử viên vacxin mới đầy hứa hẹn.

## IV. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 4.1. Nuôi cấy tế bào và virus

Nuôi cấy tế bào đại thực bào nguyên thủy lợn được chuẩn bị từ máu lợn đã được loại tơ huyết, giống như mô tả trước đây (15). Tóm tắt như sau, máu đã được xử lý heparin được ủ ấm ở 37°C trong 1 h để làm lắng hồng cầu. Bạch cầu đơn nhân được phân tách bằng tuyến nổi qua phân lớp theo tỷ trọng 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 gồm môi trường RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) với 30% chất làm nổi bề mặt L929 và 20% huyết thanh nhau thai bò bị bất hoạt bằng nhiệt (HI-FBS; Thermo Scientific, Waltham, MA) trong 48h ở 37°C với 5% CO<sub>2</sub>. Tế bào bám dính được tách ra khỏi đĩa nhựa bằng cách sử dụng 10mM EDTA trong dung dịch đệm PBS và tiếp đến chúng được chuyển vào trong các bình Primaria T25 và các đĩa 6 hoặc 96-giếng với đậm độ  $5 \times 10^6$  tế bào/ml để sử dụng trong thử nghiệm, được thực hiện 24h sau đó.

Biểu đồ so sánh sự tăng trưởng giữa virus ASFV-G và ASFV-G-ΔI177L được thực hiện trong nuôi cấy tế bào đại thực bào nguyên thủy lợn. Các lớp phủ đơn đã tạo sẵn được chuẩn bị trong các đĩa 24 giếng và được gây nhiễm ở MOI 0,01 (dựa trên HAD<sub>50</sub> được xác định trước đó trong nuôi cấy tế bào đại thực bào nguyên thủy). Sau 1h hấp phụ ở 37°C với 5% CO<sub>2</sub>, dịch nuôi cấy đã được loại bỏ và tế bào được rửa hai lần bằng PBS. Lớp phủ đơn sau đó đã được rửa bằng môi trường đại thực bào và ủ ấm trong 2, 24, 48, 72 và 96h ở 37°C với 5% CO<sub>2</sub>. Ở thời gian sau gây nhiễm xác định, tế bào được cấp đông ở  $-70^\circ\text{C}$ , dịch

tan đông đã được sử dụng để xác định hiệu giá bằng  $HAD_{50}/ml$  trong nuôi cấy tế bào đại thực bào nguyên thủy lợn. Tất cả các mẫu đều được chạy đồng thời để tránh sự biến đổi giữa các phép thử.

Hiệu giá virus đã được thực hiện trên nuôi cấy tế bào đại thực bào nguyên thủy lợn trong đĩa 96 giếng. Pha loãng và nuôi cấy virus được thực hiện trong môi trường đại thực bào. Sự có mặt của virus được kiểm tra bằng hấp phụ hồng cầu (HA) và hiệu giá virus được tính toán bằng phương pháp Reed and Muench (26).

Chủng ASFV Georgia (ASFV-G) thực địa được cung cấp bởi Nino Vepkhvadze (Cộng hòa Georgia).

#### 4.2. Phân tích microarray

Dữ liệu microarray về khung đọc mở ASFV thu được trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi (27) và gửi vào NCBI, đã được sử dụng. Tóm tắt như sau: RNA tổng số được chiết tách từ dịch nuôi cấy tế bào đại thực bào lợn nguyên thủy bị nhiễm chủng ASFV Georgia hoặc mẫu đối chứng thu ở các ngày 3, 6, 9, 12, 15 và 18 h sau gây (hpi). Một microarray cho lợn được thiết kế riêng và sản xuất bởi Agilent Technologies (Chicopee, MA) đã được sử dụng trong nghiên cứu này. RNA của cả mẫu gây nhiễm và mẫu đối chứng được gắn nhãn bằng Cy3 và Cy5 sử dụng kit ghi nhãn RNA low-input (Agilent Technologies). Mẫu được gây nhiễm và mẫu đối chứng được gắn nhãn Cy5 được lai đồng thời với các mẫu được gắn Cy3 trong cùng một array/dây, lần lượt cho mỗi mốc thời gian bằng thiết kế hoán đổi thuốc nhuộm. Toàn bộ các bước phân tích microarray đã được thực hiện dựa theo quy trình, hóa chất và các trang thiết bị của Agilent Technologies. Sau khi lai, mẫu được scan bằng GenePix 4000B scanner (Molecular Devices, San Jose, CA) với phần mềm GenePix Pro 6.0 ở độ phân giải 5- $\mu m$ . Hiệu chỉnh tín hiệu nền và chuẩn hóa dữ liệu của các tín hiệu microarray và phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm LIMMA. Cường độ tín hiệu của khung đọc mở RNA của ASFV được tính trung bình từ cả hai kênh Cy3 và Cy5.

Xây dựng tổ hợp ASFV-G- $\Delta I177L$ . ASFV tái tổ hợp được tạo ra bởi sự tái tổ hợp tương đồng giữa bộ gen ASFV-G ban đầu và vector chuyển tái tổ hợp bằng các quy trình gây nhiễm và chuyển tái tổ hợp sử dụng nuôi cấy tế bào đại thực bào lợn (15). Vector chuyển tái

tổ hợp (p72mCherry $\Delta I177L$ ) chứa flanking genomic regions từ amino acid 112 cho đến 150 của gen I177L, ở vị trí khoảng 1 kbp sang trái và phải của các amino acid này, và một dải gen mã hóa protein chứa gen mCherry với gen khởi động muợn ASFV p72, p72 mCherry, đã được sử dụng. Kết cấu này đã dẫn đến việc xóa 112-bp trong ORF của I177L (hình 1). Vector chuyển tái tổ hợp p72mCherry $\Delta I177L$  được tạo ra bằng cách tổng hợp DNA (Epoch Life Sciences, Missouri City, TX, USA).

Giải trình tự gen ASFV bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới. DNA của ASFV được chiết xuất từ các tế bào bị nhiễm bệnh và định lượng như mô tả trước đó. Trình tự đầy đủ của bộ gen virus được xác định như đã được mô tả trước đây (28) sử dụng máy giải trình tự Illumina NextSeq 500.

#### 4.3. Thí nghiệm trên động vật

Các thí nghiệm trên động vật được thực hiện trong điều kiện an toàn sinh học cấp 3-Agriculture (3-AG) tại các cơ sở chăm sóc động vật tại Trung tâm bệnh động vật Plum Island (PIADC) theo quy trình số 225.04-16-R, 09-07-16 được Ủy ban Chăm sóc và sử dụng động vật thể chế PIADC của Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ và Bộ An ninh Nội vụ Hoa Kỳ phê duyệt. ASFV-G- $\Delta I177L$  được đánh giá về kiểu độc lực của nó so với kiểu độc lực virus ASFV-G ban đầu bằng các lợn giống thương mại 80 đến 90 pound. Các nhóm lợn ( $n = 5$ ) được tiêm bắp (i.m.) hoặc với  $10^2$  đến  $10^6$   $HAD_{50}$  ASFV-G  $\Delta I177L$  hoặc  $10^2$   $HAD_{50}$  ASFV-G ban đầu. Các dấu hiệu lâm sàng (biếng ăn, trầm cảm, sốt, da tím tái đổi màu, đáng đi bất thường, tiêu chảy và ho) và thay đổi thân nhiệt được ghi nhận hàng ngày trong suốt thí nghiệm. Trong các thí nghiệm kiểm tra mức độ kháng bệnh, lợn đã được tiêm bắp ASFV-G  $\Delta I177L$  sau 28 ngày được thử thách bằng  $10^2$   $HAD_{50}$  của chủng độc lực ASFV-G ban đầu. Sự biểu hiện các dấu hiệu lâm sàng liên quan đến bệnh đã được ghi lại như được mô tả trước đó (13).

#### 4.4. Phát hiện kháng thể kháng ASFV

Phát hiện kháng thể kháng ASFV sử dụng ELISA gián tiếp, phương pháp sử dụng nội bộ được phát triển như mô tả trước đây (20). Tóm tắt như sau: kháng nguyên ELISA được chiết tách từ các tế bào Vero bị nhiễm ASFV. Địa MaxiSorp ELISA (Nunc, St. Louis, MO, Hoa Kỳ) được phủ 1  $\mu g$  mỗi giếng bằng dịch chiết tế bào bị nhiễm bệnh hoặc không bị

nhiễm bệnh. Các đĩa đã được gắn bằng nước muối đậm phốt phát có chứa 10% sữa tách kem (Merck, Kenilworth, NJ, Hoa Kỳ) và 5% huyết thanh dê bình thường (Sigma, St. Louis, MO). Mỗi mẫu huyết thanh lợn được thử ở nhiều độ pha loãng kháng nguyên tế bào bị nhiễm bệnh và không bị nhiễm bệnh. Các kháng thể đặc hiệu ASFV trong huyết thanh lợn được phát hiện bởi IgM hoặc IgG kháng lợn được gắn hỗ trợ horseradish peroxidase/enzyme chiết xuất từ cây cải ngựa (KPL, Gaithersburg, MD, USA) và chất nền SureBlue dự trữ peroxidase (KPL). Các đĩa được đọc ở mật độ quang 630 nm (OD630 bằng máy đọc đĩa ELx808 (BioTek, Shoreline, WA, USA). Hiệu giá huyết thanh được thể hiện dưới dạng log<sub>10</sub> của độ pha loãng cao nhất, ở đó OD630 của huyết thanh của lợn thử nghiệm cao ít nhất gấp đôi huyết thanh của lợn đối chứng.

#### Lời cảm ơn:

Chúng tôi cảm ơn nhân viên đơn vị Chăm sóc động vật Trung tâm Dịch bệnh động vật Plum Island vì sự hỗ trợ kỹ thuật tuyệt vời. Chúng tôi đặc biệt cảm ơn Melanie V. Prarat vì đã chỉnh sửa bản thảo.

Nghiên cứu này được hỗ trợ một phần theo sắc lệnh đối với chương trình tham gia nghiên cứu của Trung tâm Dịch bệnh động vật Plum Island (PIADC) do Viện Khoa học và Giáo dục Oak Ridge (ORISE) quản lý thông qua một thỏa thuận liên ngành giữa Bộ Năng lượng Hoa Kỳ (DOE) và Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ (USDA). ORISE được quản lý bởi ORAU theo hợp đồng DOE DE-SC0014664. Dự án này được tài trợ một phần thông qua thỏa thuận liên ngành với Tổng cục Khoa học và Công nghệ của Bộ An ninh Nội vụ Hoa Kỳ theo các giải thưởng 70RSAT19KPM000056 và 70RSAT18KPM000134.

Tất cả các ý kiến được thể hiện trong bài viết này là của các tác giả và không nhất thiết phản ánh các chính sách và quan điểm của USDA, ARS, APHIS, DHS, DOE hoặc ORAU/ORISE.

Douglas P. Gladue và Manuel V. Borca đã điền đơn xin cấp bằng sáng chế của Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ đề nghị công nhận ASFV-G-A1177L như một loại vắc xin giảm độc lực sống cho dịch tả lợn châu Phi.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tulman ER, Delhon GA, Ku BK, Rock DL., 2009. African swine fever virus, p 43–87. In Van Etten JL. (ed), *Lesser known large dsDNA viruses*, vol 328 Springer-Verlag, Berlin, Germany.
2. 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.
3. 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.
4. Coggins L., 1974. African swine fever virus. Pathogenesis. *Prog Med Virol* 18:48–63.
5. Forman AJ, Wardley RC, Wilkinson PJ., 1982. The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of African swine fever virus. *Arch Virol* 74:91–100.
6. Kihm UAM, Mueller H, Pool R., 1987. *Approaches to vaccination African swine fever*. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, MA.
7. Mebus CA., 1988. African swine fever. *Adv Virus Res* 35:251–269.
8. 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.
9. Ruiz-Gonzalvo FC, Bruyel V., 1981. Immunological responses of pigs to partially attenuated ASF and their resistance to virulent homologous and heterologous viruses. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome, Italy.
10. 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. doi:10.1128/jvi.74.3.1275-1285.2000.
11. 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. doi:10.1128/JVI.72.12.10310-10315.1998.
12. O'Donnell V, Holinka LG, Gladue DP, Sanford B,

- Krug PW, Lu X, Arzt J, Reese B, Carrillo C, Risatti GR, Borca MV., 2015. 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* 89:6048–6056.
13. O'Donnell V, Holinka LG, Krug PW, Gladue DP, Carlson J, Sanford B, Alfano M, Kramer E, Lu Z, Arzt J, Reese B, Carrillo C, Risatti GR, Borca MV., 2015. 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* 89:8556–8566.
  14. O'Donnell V, Holinka LG, Sanford B, Krug PW, Carlson J, Pacheco JM, Reese B, Risatti GR, Gladue DP, Borca MV., 2016. African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of 9GL and MGF360/505 genes is highly attenuated in swine but does not confer protection against parental virus challenge. *Virus Res* 221:8–14.
  15. 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.
  16. Forth JH, Forth LF, King J, Groza O, Hubner A, Olesen AS, Hoper D, Dixon LK, Netherton CL, Rasmussen TB, Blome S, Pohlmann A, Beer M., 2019. A deep-sequencing workflow for the fast and efficient generation of high-quality African swine fever virus whole-genome sequences. *Viruses* 11:846.
  17. Onisk DV, Borca MV, Kutish G, Kramer E, Irusta P, Rock DL., 1994. Passively transferred African swine fever virus antibodies protect swine against lethal infection. *Virology* 198:350–354.
  18. Ruiz Gonzalvo F, Carnero ME, Caballero C, Martínez J., 1986. Inhibition of African swine fever infection in the presence of immune sera in vivo and in vitro. *Am J Vet Res* 47:1249–1252.
  19. Oura CA, Denyer MS, Takamatsu H, Parkhouse RM., 2005. *In vivo* depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. *J Gen Virol* 86:2445–2450.
  20. Carlson J, O'Donnell V, Alfano M, Velazquez Salinas L, Holinka LG, Krug PW, Gladue DP, Higgs S, Borca MV., 2016. Association of the host immune response with protection using a live attenuated African swine fever virus model. *Viruses* 8:291.
  21. 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.
  22. O'Donnell V, Risatti GR, Holinka LG, Krug PW, Carlson J, Velazquez-Salinas L, Azzinaro PA, Gladue DP, Borca MV., 2017. 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* 91:e01760-16.
  23. Ramirez-Medina E, Vuono E, O'Donnell V, Holinka LG, Silva E, Rai A, Pruitt S, Carrillo C, Gladue DP, Borca MV., 2019. Differential effect of the deletion of African swine fever virus virulence-associated genes in the induction of attenuation of the highly virulent Georgia strain. *Viruses* 11:599.
  24. Sanford B, Holinka LG, O'Donnell V, Krug PW, Carlson J, Alfano M, Carrillo C, Wu P, Lowe A, Risatti GR, Gladue DP, Borca MV., 2016. Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus. *Virus Res* 213:165–171.
  25. Costard S, Porphyre V, Messad S, Rakotondrahanta S, Vidon H, Roger F, Pfeiffer DU. Exploratory multivariate analysis for differentiating husbandry practices relevant to disease risk for pig farmers in Madagascar. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome, Italy.
  26. Reed LJ, Muench H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 27:493–497.
  27. Zhu JJ, Ramanathan P, Bishop EA, O'Donnell V, Gladue DP, Borca MV., 2019. Mechanisms of African swine fever virus pathogenesis and immune evasion inferred from gene expression changes in infected swine macrophages. *PLoS One* 14:e0223955.
  28. Borca MV, Holinka LG, Berggren KA, Gladue DP., 2018. CRISPR-Cas9, a tool to efficiently increase the development of recombinant African swine fever viruses. *Sci Rep* 8:3154.
  29. Cackett G, Matelska D, Sýkora M, Portugal R, Malecki M, Bähler J, Dixon L, Werner F., 2019. Temporal transcriptome and promoter architecture of the African swine fever virus. *bioRxiv* doi: 10.1101/847343.

**TS. Ngô Chung Thủy, Viện Thú y dịch.**