

TÍNH AN TOÀN VÀ MIỄN DỊCH CỦA VIRUS DỊCH TẢ HEO CHÂU PHI NHƯỢC ĐỘC, CHỦNG G-DELTA-I177L TRÊN HEO

Trần Xuân Hạnh¹, Lê Thị Thu Phương¹, Nguyễn Quang Huy¹, Đỗ Thanh Thủy¹, Nguyễn Văn Dung¹, Quách Vô Ngôn¹, Nguyễn Tấn Liêm¹, Hồ Nguyễn Hải Vy¹, Huỳnh Thị Ngọc Ánh¹, Bùi Anh Thy¹, Trần Hữu Huy¹, Đào Huỳnh Thiên Thanh¹, Phạm Thị Yến Như¹, Nguyễn Đức Huy¹, Nguyễn Thanh Hoài¹, Đỗ Thị Thùy Dung¹, Phạm Hà Quang¹, Trần Thu Lâm¹, Nguyễn Thị Thủy¹, Đoàn Ngọc Trung¹, Tạ Hoàng Long², Nguyễn Thị Thúy Hà², Hoàng Thị Thu Hương², Nguyễn Trung Tiến², Phạm Quang Trung², Bạch Đức Lữ³, Võ Văn Hùng³, Nguyễn Thanh Phương³, Cyril Gay⁴, Manuel Borca⁴, Douglas Gladue⁴

TÓM TẮT

Thí nghiệm được thực hiện nhằm đánh giá tính an toàn và miễn dịch của chủng virus DTHCP nhược độc, chủng G-delta-I177L. Kết quả nghiên cứu cho thấy virus chủng G-delta-I177L thuộc genotype II, có khả năng nhân lên tốt trên tế bào PBMC và BMC. Chủng virus này an toàn khi tiêm cho heo, ngay cả khi sử dụng liều cao 10^6 HAD₅₀, gấp 10.000 lần liều miễn dịch bảo hộ 100% heo thí nghiệm.

Bằng phương pháp thử thách cường độc, heo tiêm virus DTHCP chủng G-delta-I177L kích thích đáp ứng miễn dịch tốt và có khả năng bảo hộ được heo chống lại virus DTHCP cường độc gây bệnh DTHCP cho heo tại Việt Nam. Điều này chứng tỏ virus DTHCP nhược độc chủng G-delta-I177L có tính tương đồng kháng nguyên bảo hộ với virus DTHCP cường độc lưu hành tại Việt Nam. Từ kết quả nghiên cứu thu được, có thể dùng chủng virus DTHCP G-delta-I177L để sản xuất vacxin phòng bệnh DTHCP cho đàn heo nuôi tại Việt Nam.

Từ khóa: Chủng virus DTHCP G-delta-I177L, thử thách cường độc, đáp ứng miễn dịch.

Property of safety and immunity of attenuated African swine fever virus, strain G-delta-I177L for pigs

Tran Xuan Hanh, Nguyen Van Dung, Le Thi Thu Phuong, Nguyen Quang Huy, Do Thanh Thuy, Quach Vo Ngon, Nguyen Tan Liem Ho, Nguyen Hai Vy, Huynh Thi Ngoc Anh, Bui Anh Thy, Tran Huu Huy, Dao Huynh Thien Thanh, Pham Thi Yen Nhu, Nguyen Duc Huy, Nguyen Thanh Hoai, Do Thi Thuy Dung, Pham Hao Quang, Tran Thu Lam, Nguyen Thi Thuy, Doan Ngoc Trung, Ta Hoang Long, Nguyen Thi Thuy Ha, Hoang Thi Thu Huong, Nguyen Trung Tien, Pham Quang Trung, Bach Duc Luu, Vo Van Hung, Nguyen Thanh Phuong, Cyril Gay, Manuel V. Borca, Douglas P. Gladue

SUMMARY

The study was carried out with the aims to test safety and immunity of the attenuated ASFV strain G-delta-I177L. The studied results showed that ASFV strain G-delta-I177L belonged to genotype II, possessed ability to multiply well on the PBMC and BMC cells.

ASFV strain G-delta-I177L was safe to inject to pigs even when using high dose of 10^6 HAD₅₀, 10^4 times higher than that of minimum immunizing dose (10^2 HAD₅₀) to protect 100% pigs.

¹ Công ty cổ phần thuốc thú y trung ương Navetco

² Trung tâm kiểm nghiệm thuốc thú y trung ương I

³ Chi cục Thú y vùng 6

⁴ Trung tâm nghiên cứu bệnh gia súc Plum Island, Hoa Kỳ

By challenge experiments demonstrated that the pigs that injected with ASFV strain G-delta-I177L could stimulate immune response and be able to protect pigs against the virulent ASFV causing ASF in pigs in Viet Nam. This proves that ASFV strain G-delta-I177L has matching protective antigens to the virulent ASFV circulating in Viet Nam. From the studied results obtained, it is suggested that ASFV strain G-delta-I177L can be used to product ASF vaccine against ASF for pigs raising in Viet Nam.

Keywords: ASFV strain G-delta-I177L, challenge test, immune response.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dịch tả heo châu Phi (DTHCP) là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm do virus gây ra trên heo, có thể gây chết 100% số lợn mắc bệnh. Bệnh được mô tả lần đầu tiên vào năm 1921 tại Kenya và sau đó lây lan rộng trong khu vực. Năm 2007, bệnh xảy ra ở các nước thuộc vùng Caucasus và lây lan nhanh sang một số nước ở châu Âu (Natasha, 2019). Gần đây bệnh đã được phát hiện ở Trung Quốc và các nước lân cận như: Mông Cổ, Việt Nam, Lào, Campuchia và Hàn Quốc.

Theo báo cáo của Cục Thú y, bệnh DTHCP được phát hiện đầu tiên tại Việt Nam vào tháng 2/2019 tại tỉnh Thái Bình và Hưng Yên. Bệnh sau đó lây lan trên diện rộng, gây thiệt hại nghiêm trọng cho chăn nuôi heo tại nước ta. Chỉ tính từ đầu tháng 2/2019 đến 8/7/2019 đã có 5.422 xã thuộc 513 huyện của 62 tỉnh/thành phố có dịch với tổng số heo tiêu hủy là 3.306.038 con (Bộ NN & PTNT).

Đã có nhiều công trình nghiên cứu vaccin phòng bệnh DTHCP, nhiều phương pháp đã được sử dụng để tạo ra các chủng virus DTHCP đạt các yêu cầu dùng sản xuất vaccin. Tuy nhiên cho đến nay vẫn chưa có vaccin phòng bệnh DTHCP. Gần đây, Borca (2017, 2019) đã thành công trong việc chỉnh sửa gen của virus DTLCP, áp dụng hệ thống CRISPR/Cas9 sử dụng tế bào chủ là đại thực bào để tạo ra các chủng virus vaccin DTHCP nhược độc, trong đó có virus DTHCP chủng G-delta-I177L.

Để có cơ sở sử dụng chủng G-delta-I177L (viết tắt là I177L) trong nghiên cứu sản xuất vaccin phòng bệnh DTHCP, chúng tôi xin trình bày một số kết quả nghiên cứu về chủng virus DTHCP nhược độc I177L.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

2.1. Vật liệu thí nghiệm

2.1.1. Giống virus DTHCP chủng G-delta-I177L

Virus DTHCP nhược độc, chủng G-delta-I177L (viết tắt I177L) nhận từ Trung tâm nghiên cứu bệnh gia súc Hoa Kỳ. Chủng virus nhược độc I177L được nghiên cứu phát triển từ chủng gốc ASFV-G và được xóa gen I177L bao gồm 112 nucleotide. Chủng I177L được công ty Navetco nhập vào Việt Nam theo giấy phép số 1160/TY-QLT do Cục Thú y cấp ngày 29/7/2020 và giấy phép xuất khẩu của phía Hoa Kỳ số D120826, ngày 6/7/2020.

2.1.2. Giống virus cường độc

Virus cường độc DTHCP phân lập tại các ổ bệnh DTHCP ở Việt Nam, nhận được từ Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y TW 1 (ký hiệu TTKN/ASFV/ĐN/2019) và Chi cục Thú y vùng 6 (ký hiệu CCTY6/ASFV/TG/2019).

2.1.3. Môi trường và dụng cụ nuôi cấy tế bào

- Môi trường RPMI 1640 (Gibco, code 31800-089); huyết thanh bào thai bê (Gibco, code 16000-044); đĩa 96 giếng (Corning Primaria, code 353872); chai nuôi tế bào T150 có filter (Cellbinding, code 3289), T75 (Corning Primaria, code 353810), T150 filter CellBinding (Corning, code 3291).

- Dụng cụ lấy mẫu dịch mũi: Tăm bông đã tiệt trùng của Công ty cổ phần thiết bị y tế Bảo Thạch. Ống nghiệm lấy máu kháng đông: Ống nghiệm EDTA K2 của Công ty cổ phần thiết bị y tế Hồng Thiện Mỹ.

- Patho Gene-spin™ DNA/RNA Extraction kit (Intron, 17154); QIAmp DNA Blood Mini kit (Qiagen, 51106); Platinum™ Quantitative PCR SuperMix-UDG (Thermo); VetMAX™ African swine fever virus detection kit (Thermo, A28809); PCRBio HS Taq Mix Red (PCRBio, PB10.23-10); Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder (NEB, B7025).

2.1.4. Động vật thí nghiệm

Heo 1,5 -3 tháng tuổi, giống heo lai Yorkshire và Landrace, trọng lượng 20 - 30 kg hoặc giống heo địa phương (Giống heo Móng Cái), khỏe mạnh, chưa tiêm vaccin DTHCP hoặc không có kháng thể kháng DTHCP và âm tính với kháng nguyên DTHCP.

2.2. Phương pháp thí nghiệm

2.2.1. Nuôi cấy tế bào và gây nhiễm virus

Tế bào BMC (Bone Marrow Cell) và PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) thu nhận từ heo theo quy trình của SCIRO Australian Animal Health Laboratory (AAHL, 2018), EU (2018) (Carrascosa, 2011). Phương pháp tóm tắt như sau: Lấy máu heo có chất kháng đông EDTA hoặc heparin. Máu được xử lý với đệm dung giải (lysis buffer) theo tỷ lệ 1/1 và để nhiệt độ phòng 10-15 phút. Ly tâm thu cặn, sau đó rửa cặn bằng môi trường duy trì PBMC. Hoàn nguyên cặn PBMC dùng môi trường tăng trưởng RPMI 1640. Ra chai nuôi với số lượng 50 triệu/ T25, 50 triệu/ đĩa 96 giếng.

Gây nhiễm virus: Sau khi tế bào được nuôi 3-4 ngày ở 37°C, 5% CO₂, kiểm tra chất lượng tế bào, hút bỏ dịch nuôi cấy trong chai tế bào. Cho 1 ml huyền dịch virus/chai T25 với MOI 0,01. Nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂ trong 60 phút. Loại bỏ dịch nhiễm và rửa tế bào bằng PBS. Cho 10 ml môi trường tăng trưởng vào chai tế bào T25, sau đó tiếp tục nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂. Theo dõi kiểm tra CPE hàng ngày, trong vòng 5-7 ngày. Thu hoạch huyền dịch virus tế bào khi khoảng 80% tế bào có CPE và bảo quản ở -70°C cho đến khi sử dụng.

Thí nghiệm đánh giá tính an toàn và miễn dịch của virus DTHCP chủng I177L.

2.2.2. Kiểm tra tính an toàn trên heo

Tổng số 25 heo được chia làm 5 nhóm, mỗi nhóm 5 heo. Huyền dịch virus được pha thành các nồng độ: 10¹, 10², 10³, 10⁴ và 10⁶ HAD₅₀/ml, mỗi nồng độ tiêm cho 5 heo, mỗi heo 1 ml, tiêm bắp thịt sau gốc tai. Heo sau khi tiêm virus được nuôi riêng trong các ô chuồng riêng biệt và được theo dõi hàng ngày về thân nhiệt và các biểu hiện lâm sàng. Thời gian theo dõi 28 ngày. Ở ngày thứ 7, 14, 21, 28, heo ở các nồng độ được lấy mẫu (dịch ngoáy mũi và máu có chống đông) để kiểm tra khả năng bài virus và nhiễm virus huyết bằng phương pháp PCR.

2.2.3. Tính miễn dịch của chủng I177L và xác định liều PD₅₀

Heo thí nghiệm được chia thành 5 nhóm, mỗi nhóm 5 heo, trong đó heo từ nhóm 1 đến nhóm 4 thuộc nhóm miễn dịch và heo của nhóm 5 dùng làm đối chứng. Virus DTHCP chủng I177L được pha thành các nồng độ 10¹, 10², 10³, 10⁴ HAD₅₀. Mỗi nồng độ được tiêm miễn dịch cho một nhóm heo tương ứng từ nhóm 1 đến nhóm 4, liều 1 ml/con/tiêm bắp thịt sau gốc tai. Heo nhóm 5 tiêm môi trường tế bào không virus, liều 1 ml/con/tiêm bắp. Sau tiêm virus, heo của các nhóm được nuôi nhốt cách ly trong các ô chuồng khác nhau và có chế độ chăm sóc, nuôi dưỡng giống nhau.

Kiểm tra đáp ứng và sự hiện diện của kháng thể DTHCP bằng phương pháp ELISA ở các thời điểm 7, 14, 21 và 28 ngày. Tại thời điểm 28 ngày sau khi tiêm virus, tất cả heo ở các lô miễn dịch, kèm theo 5 heo của lô đối chứng được tiến hành thử thách cường độc với virus DTHCP cường độc phân lập tại Việt Nam, chủng TTKN/ASFV/DN/2019, với liều công 10² HAD₅₀/con/tiêm bắp.

Sau công, heo được kiểm tra thân nhiệt và theo dõi biểu hiện lâm sàng hàng ngày. Thời gian theo dõi 21 ngày. Heo ở nhóm đối chứng

và miễn dịch chết được mổ khám kiểm tra bệnh tích và lấy mẫu bệnh phẩm xác định nguyên nhân gây chết. Số heo sống/chết ở các nông độ được ghi nhận và tính toán liều PD_{50} theo Reed-Muench (1938).

2.2.4. Kiểm tra đáp ứng kháng thể bằng phương pháp ELISA

Thí nghiệm sử dụng 2 phương pháp:

- Sử dụng kit phát hiện kháng thể ASFV Ingezim PPA Compac, Ingenas Spain, code 11.PPA.K.315 và thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- NAVETCO – ELISA: Đĩa 96 lỗ Nunc Maxisorp (Thermo, code 44240121); PBS tablet (Invitrogen, code 003002); Tween 20 (Thermo, code 85113); dung dịch block: 10% Skim milk (Difco, code 232100) và 5% huyết thanh ngựa (Viện Pasteur Nha trang); conjugate anti-pig IgG produced in rabbit (Sigma, code 037K4835); TMB (Sigma, code T0440); Stop solution H_2SO_4 1N (Merck, code 1007311000); và kháng nguyên tự chế từ virus DTHCP cường độc, phân lập tại Việt Nam và chế theo Borca M. (ARS, USA).

2.2.5. Phát hiện virus DTHCP bằng phương pháp realtime-PCR

Sử dụng kit realtime-PCR thương mại Vetmax, thực hiện theo quy trình OIE.

Trình tự mỗi và mẫu dò (King *et al.*, 2003):

ASF-F: 5'-CTGCTCATGGTATCAATCTT ATCTT AT CGA -3'

ASF-R: 5'-GATACCACAAGATC(AG)GC CGT-3'

ASF-probe:FAM-CCACGGAGGGGAGGA ATACCAACCCAGTG-TAMRA

Chu kỳ nhiệt: Hoạt hóa 50°C – 95°C (2' – 10'), biến tính 95°C (15''), bắt cặp 60°C (1').

Đánh giá kết quả: Mẫu xét nghiệm dương tính khi giá trị Ct < 45, mẫu xét nghiệm âm tính khi giá trị Ct > 45 hoặc không có Ct.

+ Cặp mỗi ARS (Borca M, Mỹ)

Trình tự mỗi:

ARS-F: 5'-GAACTGGAAAAACTTTAA CGGC-3'

ARS-R: 5' - CCATTACCGGCAAGCT AGG - 3'

Đoạn dò ASFV: FAM-ACGGATCCCCCTT CGCATTGA-MGBF.

Chu trình nhiệt: Hoạt hóa 50°C – 95°C (2' – 2'), biến tính 95°C (20''), bắt cặp 60°C (1').

Đánh giá kết quả: Mẫu xét nghiệm dương tính khi giá trị Ct < 35, mẫu xét nghiệm âm tính khi giá trị Ct > 35.

III. KẾT QUẢ THÍ NGHIỆM

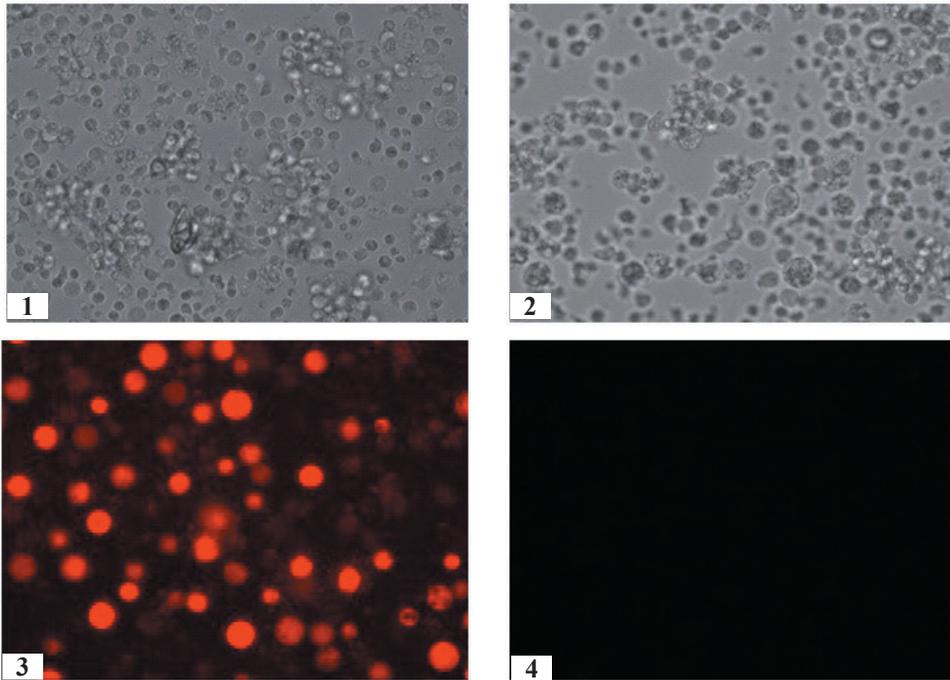
3.1. Khả năng nhân lên của virus DTHCP chủng I177L trên tế bào BMC

Khả năng nhân lên của virus trên môi trường tế bào BMC hoặc PBMC được chứng minh bằng hiệu giá virus qua các lần cấy chuyển. Từ chủng virus gốc nhận được, virus DTHCP chủng I177L được cấy chuyển lên tế bào BMC. Kiểm tra bệnh tích tế bào (CPE) hàng ngày. Thu hoạch ở thời điểm 72 giờ sau gây nhiễm. Mẫu sau đó được lấy và xử lý đông tan để chuẩn độ xác định hiệu giá virus. Kết quả trình bày ở bảng 1.

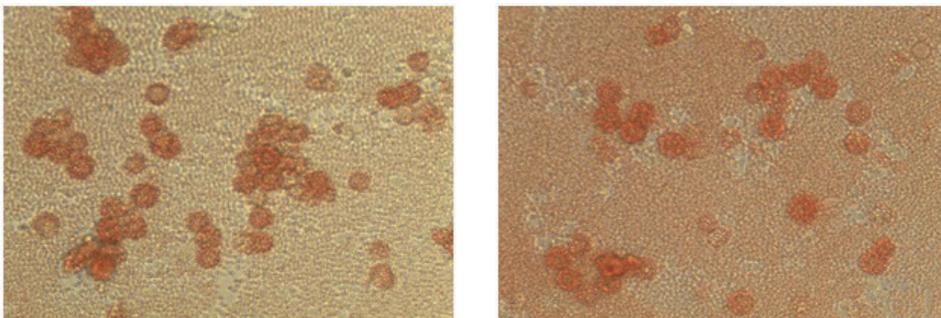
Bảng 1. Hiệu giá virus qua các đời cấy chuyển trên tế bào PBMC

STT	Lần cấy chuyển	Hiệu giá ($\log_{10} HAD_{50}$)
1	Mẫu gốc	6,67
2	P1	6,50
3	P2	6,33 – 7,00
4	P3	6,0 – 7,33
5	P4	6,33- 7,00

Kết quả cho thấy hiệu giá virus ở các lần cấy chuyển không có sự khác nhau và khá ổn định so với với mẫu virus gốc. Ở lần tiếp đời thứ nhất, hiệu giá thu được là $10^{6.5} HAD_{50}/ml$. Ở các đời tiếp theo hiệu giá virus nằm trong khoảng từ $10^{6.0}$ đến $10^{7.3} HAD_{50}/ml$.



Hình 1. 1. Tế bào đối chứng, 2. Virus gây CPE dưới ánh sáng thường (400X), 3. Virus dưới kính hiển vi huỳnh quang (400X), 4. Đối chứng dưới KHVHQ

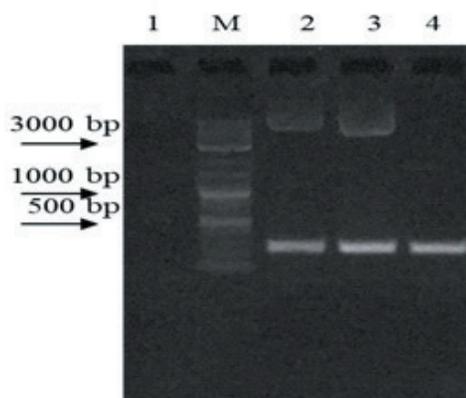


Hình 2. Ảnh tạo hoa hồng của virus DTHCP trên tế bào BMC (400X)

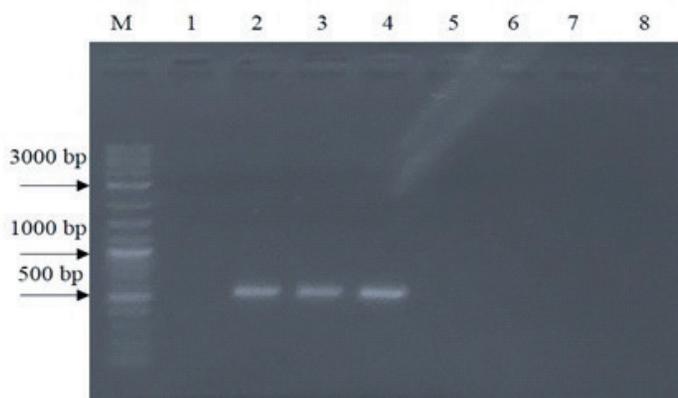
3.2. Giám định virus DTHCP chủng I177L

Bằng phương pháp PCR, sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho virus DTHCP, kết quả giám định cho thấy chủng I177L thuộc genotype II và có sản phẩm PCR khoảng 257 bp, giống kích thước thu được khi thực hiện PCR với các chủng virus DTHCP cường độc lưu hành tại Việt Nam. Để phân biệt giữa virus DTHCP

cường độc (chủng phân lập tại Việt Nam) và virus DTHCP nhược độc chủng I177L, sử dụng cặp mồi xác định gen mục tiêu là I177L. Sản phẩm chạy PCR xác định gen đích I177L có kích thước khoảng 534 bp và chỉ thị này sẽ phân biệt giữa chủng virus cường độc DTHCP và virus nhược độc DTHCP chủng I177L, chủng đã được loại bỏ gen I177L. Kết quả ghi nhận tại hình 3 và hình 4.



Hình 3. Giếng 1: Mẫu dịch chiết tế bào BMC; 2: Mẫu virus cường độc DTHCP, chủng ĐN; 3: Mẫu virus cường độc DTHCP chủng TG; 4: Mẫu virus DTHCP chủng I177L; M: Marker.



Hình 4. Giếng 1: Mẫu nước cất; 2: Mẫu virus DTHCP cường độc, chủng TG; 3: Mẫu virus DTHCP cường độc, chủng ĐN; 4: Mẫu virus nhược độc DTHCP, chủng BA71v; 5: Mẫu virus DTHCP nhược độc, chủng I177L; 6: Mẫu tế bào PBMC; 7: Mẫu tế bào BMC; 8: Mẫu môi trường nuôi cấy; M: Marker

3.3. Đánh giá tính an toàn của giống

Sau khi tiêm virus DTHCP chủng I177L với các liều khác nhau, heo được tiêm vẫn biểu hiện tình trạng sức khỏe bình thường, kể cả heo được tiêm ở nồng độ cao (10^6 HAD₅₀). Nhìn chung thân nhiệt của heo không có nhiều biến động, vẫn duy trì ở mức bình thường từ 38,5 – 39,5°C. Theo dõi về biểu hiện lâm sàng không ghi nhận

bất cứ dấu hiệu bất thường nào, cũng như không có triệu chứng thường gặp do virus DTHCP gây ra. Tất cả heo ở các lô ăn uống và ở trạng thái sức khỏe bình thường. Sau thời gian theo dõi 28 ngày, tất cả heo đều sống khỏe mạnh và phát triển bình thường. Từ kết quả về các biểu hiện lâm sàng quan sát được cho thấy virus DTHCP chủng I177L an toàn khi tiêm cho heo (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả kiểm tra tính an toàn của virus DTHCP chủng I177L

Nhóm TN	Số lượng heo	Liều tiêm (HAD ₅₀)	Đường tiêm	Sống/Tổng số	Kết luận
1	5	10^1	Tiêm bắp	5/5	An toàn
2	5	10^2	Tiêm bắp	5/5	An toàn
3	5	10^3	Tiêm bắp	5/5	An toàn
4	5	10^4	Tiêm bắp	5/5	An toàn
5	5	10^6	Tiêm bắp	5/5	An toàn
6	5	Đối chứng	Không	5/5	

Để đánh giá mức độ bài virus và nhiễm virus huyết sau khi tiêm virus DTHCP chủng I177L, mẫu dịch mũi và mẫu máu của heo được lấy vào các ngày 7, 14, 21

và 28 sau khi tiêm virus. Mẫu được xử lý và xác định sự hiện diện của virus bằng phương pháp PCR. Kết quả trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả bài virus và virus huyết trên heo tiêm chủng I177L

Nhóm TN	Nồng độ (HAD ₅₀)	Số lượng heo (con)	Mẫu dịch mũi				Mẫu máu			
			7	14	21	28	7	14	21	28
1	10 ¹	5	4/5	1/5	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5
2	10 ²	5	1/5	0/5	0/5	0/5	4/5	4/5	3/5	0/5
3	10 ³	5	3/5	0/5	0/5	0/5	2/5	5/5	3/5	0/5
4	10 ⁴	5	4/5	0/5	0/5	0/5	5/5	4/5	1/5	0/5
5	10 ⁶	5	5/5	4/5	0/5	0/5	1/5	1/5	2/5	2/5
Tổng số			17/25	5/25	0/25	0/25	12/25	16/25	9/25	2/25

Ở tất cả các nồng độ tiêm, sự bài tiết virus đã được phát hiện ở 7 ngày sau gây nhiễm với 17/25 (68%) mẫu dịch mũi kiểm tra có kết quả dương. Kiểm tra ở ngày 14 ghi nhận có sự giảm bài virus rõ rệt, thể hiện ở mẫu dương giảm xuống chỉ còn 5/25 (20%) so sánh với kết quả kiểm tra ở ngày 7. Sau thời điểm này, không phát hiện được virus ở các mẫu dịch mũi khi kiểm tra ở các ngày 21 và 28 (bảng 3).

Như kết quả thu được từ mẫu dịch mũi, hiện tượng nhiễm virus huyết cũng được phát hiện ở ngày 7, với 12/25 (48%) mẫu dương tính. Số heo được xác định nhiễm virus huyết tăng lên ở ngày

thứ 14 (16/25 – 64%), sau đó giảm xuống còn 9/25 (36%) mẫu ở ngày 21. Ở ngày 28, tất cả các mẫu máu heo ở các lô với các liều khác nhau đều cho kết quả âm tính, loại trừ heo tiêm với nồng độ 10⁶ HAD₅₀ còn 2 heo có kết quả dương tính (bảng 3).

3.4. Kiểm tra tính miễn dịch của virus DTHCP chủng I177L

3.4.1. Đáp ứng kháng thể và khả năng bảo hộ của heo sau tiêm virus I177L

Sau tiêm virus 7, 14, 21 và 28 ngày, heo được lấy máu kiểm tra tình trạng miễn dịch, kết quả trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Đáp ứng kháng thể của heo sau khi tiêm virus DTHCP chủng I177L

Nhóm TN	Liều HAD ₅₀	SL heo	ELISA				Trung hòa (VNT)				
			Trước tiêm	7	14	21	28	7	14	21	28
1	10 ¹	5	0/5	0/5	1/5	2/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	10 ²	5	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3	10 ³	5	0/5	0/5	1/5	4/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4	10 ⁴	5	0/5	0/5	1/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5
5	10 ⁶	5	0/5	0/5	3/5	5/5	5/5	KL	KL	KL	KL
Tổng số		25	0/25	0/25	6/25	21/25	22/25	0/20	0/20	0/20	0/20

Ghi chú: SL: Số lượng, KL: Không làm

Heo sau khi tiêm virus DTHCP chủng I177L, kháng thể DTHCP có thể phát hiện vào ngày 14 ở một số nồng độ virus tiêm, với 6/25 (24%) mẫu dương. Tỷ lệ này tăng vào ngày 21 và 28 tương ứng với tỷ lệ 84% và 88% (bảng 4).

Theo dõi đáp ứng kháng thể ở heo theo các

nhóm tiêm với các liều virus khác nhau cho thấy ngoại trừ nhóm heo tiêm liều 10¹ HAD₅₀ (chỉ có 2/5 heo có đáp ứng kháng thể), các nhóm còn lại tất cả heo đều cho kết quả dương tính ở ngày 28 sau tiêm virus. Điều lưu ý là không có mẫu huyết thanh nào dương ở tất cả các nồng độ khi kiểm tra bằng phản ứng trung hòa.

Tại thời điểm ngày 28 sau tiêm, tất cả heo miễn dịch ở các lô 1, 2, 3, 4 và 5 heo đối chứng không tiêm vaccin được công thử

thách với virus cường độc DTHCP, liều 10^2 HAD₅₀/con/tiêm bắp, kết quả trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả thử thách với virus DTHCP cường độc

Nhóm TN	Số lượng heo	Liều HAD ₅₀	Liều công	Sống/tổng số	Tỷ lệ bảo hộ (%)
1	5	10^1	10^2 HAD ₅₀ /con/ tiêm bắp	2/5	40
2	5	10^2		5/5	100
3	5	10^3		5/5	100
4	5	10^4		5/5	100
5	5	Đối chứng		0/5	0,0

Theo dõi sau khi công cho thấy hầu hết heo được được tiêm liều 10^2 , 10^3 , 10^4 HAD₅₀ khỏe mạnh, ăn uống, vận động bình thường. Riêng heo ở lô tiêm nồng độ 10^1 HAD₅₀, 3/4 heo có phản ứng sốt cao và 1 heo có biểu hiện sốt nhẹ. Các heo có phản ứng thân nhiệt cao và kéo dài thường kèm theo bệnh tiến triển với các triệu chứng heo bỏ ăn, ít vận động, xung huyết ngoài da, tiêu chảy và hậu quả là chết.

Sau khi công, heo ở lô đối chứng bắt đầu sốt vào ngày thứ 4. Bệnh tiến triển nặng dần với các triệu chứng: Sốt cao $\geq 41^\circ\text{C}$, xung và xuất huyết ngoài da, mũi nhiều dịch lẫn máu, hậu môn xuất huyết và đi phân có máu. Heo mệt mỏi, bỏ ăn, ít vận động và thường chết sau 4-5 ngày kể từ khi xuất hiện triệu chứng và từ 7-10 ngày sau khi công. Các bệnh tích thường gặp khi mổ khám là: Dịch mũi nhiều, có máu và bọt khí, hậu môn và bộ phận sinh dục xung huyết, phổi viêm, xuất huyết, khí quản có máu lẫn bọt khí, tim tích nước vàng, xoang bụng tích nước, xuất huyết, dạ dày xung, xuất huyết, ruột xuất

huyết, lách sưng to màu đen, thận xuất huyết. Hạch dưới hàm, hạch bẹn nông, hạch màng treo ruột sưng to, xuất huyết. Heo đối chứng chết có bệnh tích đặc trưng của bệnh DTHCP và bằng phương pháp PCR xác định nguyên nhân chết là do virus DTHCP.

Sau 21 ngày theo dõi sau công độc, ngoại trừ nhóm heo tiêm liều 10^1 HAD₅₀ sống 2/5 heo, tất cả các heo ở các nhóm tiêm liều 10^2 , 10^3 , 10^4 HAD₅₀ đều sống 100% (bảng 5). Căn cứ vào số heo sống, chết ở mỗi nồng độ, tính toán liều PD₅₀ theo Reed – Muench, liều PD₅₀ của giống virus được xác định là $10^{1,2}$ HAD₅₀.

3.4.2. Kiểm tra tình trạng miễn dịch của heo sau công độc

Kiểm tra kháng thể của heo sau công bằng kỹ thuật ELISA cho thấy heo sau khi công vẫn duy trì trạng thái miễn dịch tốt và mức độ kháng thể cao hơn so với trước khi công rất rõ thể hiện bằng giá trị X% trung bình ở các nhóm heo (bảng 6).

Bảng 6. Kết quả kiểm tra kháng thể của heo sau công cường độc

Nhóm TN	Liều HAD ₅₀	SL heo	28 ngày sau vaccin		14 ngày sau công độc		20 ngày sau công độc	
			X% TB	Kết quả	X % TB	Kết quả	X % TB	Kết quả
1	10^1	5	57,5±3,5	2/5	77,0±4,0	2/2	98,5±3,5	2/2
2	10^2	5	62,0±5,0	5/5	83,5±2,5	5/5	95,5±4,5	5/5
3	10^3	5	82,5±5,5	5/5	96,5±1,5	5/5	99,5±0,5	5/5
4	10^4	5	92,5±7,5	5/5	94,5±0,5	5/5	98,0±1,0	5/5

Kết quả bảng 6 cho thấy tất cả heo còn sống sau khi công ở các nồng độ đều có kết quả huyết thanh dương tính. Giá trị X % trung bình của các mẫu huyết thanh heo từ các nhóm khác nhau nhận thấy đồng đều hơn biểu hiện qua hệ số biến thiên (Coefficient of Variation – CV) không có biến động nhiều khi so sánh với hệ số này trước khi công.

Ngoài đánh giá khả năng ngăn chặn phát sinh triệu chứng bệnh, khả năng bảo hộ của vaccin, chúng tôi cũng đã tiến hành nghiên cứu mức độ bài virus và mang virus DTHCP cường độc trên những heo được miễn dịch với virus DTHCP nhược độc chủng I177L. Kết quả ghi nhận không phát hiện có sự hiện diện của virus DTHCP công cường độc trong mẫu dịch mũi và mẫu máu khi kiểm tra ở ngày 20 và 27 sau công.

IV. THẢO LUẬN

Sau thất bại khi nghiên cứu vaccin vô hoạt phòng bệnh DTHCP và khả năng bảo hộ hạn chế của vaccin tái tổ hợp, có lẽ hướng đi khả thi nhất để nghiên cứu vaccin phòng bệnh DTHCP là sử dụng các chủng virus DTHCP nhược độc. Người ta có thể tạo ra các chủng virus nhược độc bằng phương pháp truyền thống tiếp đời nhiều lần trên môi trường tế bào hoặc tiên tiến hơn dùng công nghệ gen. Hiện nay, một vài chủng virus nhược độc được phát triển bằng kỹ thuật gen, bao gồm loại bỏ một gen hoặc một nhóm gen đã tạo được miễn dịch chống lại chủng virus độc lực (Borca M. *et al.*, 2018, 2019; O'Donnell *et al.*, 2017; Monteagudo *et al.*, 2017; Souto *et al.*, 2014).

Đã có thông báo về thành công làm giảm độc virus DTHCP thông qua việc cấy chuyển nhiều đời qua tế bào Vero (Rodriguez *et al.*, 2015; Krug *et al.*, 2015). Virus an toàn khi tiêm cho heo, nhưng mất khả năng sinh miễn dịch đặc hiệu để có thể bảo hộ được heo khi thử thách cường độc. Đến nay có 2 nghiên cứu thành công dùng phương pháp biến đổi gen tạo ra các chủng virus DTHCP giảm độc hoàn toàn là việc loại bỏ gen 9GL (O'Donnell *et al.*, 2015) và loại bỏ một nhóm gen từ MGF360 và 530 (O'Donnell,

et al., 2015). Tuy đạt được những kết quả như vậy, nhưng khả năng bảo hộ của các chủng này vẫn chưa thực sự ổn định, có khả năng bảo hộ khi thử thách đồng chủng, nhưng khi thực hiện công độc virus DTHCP dị chủng kết quả vẫn còn rất hạn chế. Theo hướng này, Viện nghiên cứu thú y Harbin cũng nghiên cứu phát triển tạo ra một chủng virus DTHCP nhược độc bằng cách loại bỏ gen MGF360 và CD2v. Hiện vaccin chế từ chủng virus này cũng đang được nghiên cứu đánh giá trên thực địa tại Trung Quốc.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng virus DTHCP chủng I177L thuộc genotype II, được làm giảm độc bằng cách loại bỏ gen I177L bao gồm 112 nucleotide. Đây là đoạn gen được xác định có tính độc gây bệnh cho heo (Borca M., 2019). Những nghiên cứu gần đây của nhiều tác giả chỉ ra rằng các ổ dịch DTHCP trên heo ở châu Âu và châu Á đều do virus DTHCP thuộc genotype II gây ra. Người ta cũng xác nhận mức độ hạn chế về bảo hộ chéo giữa của virus DTHCP, vì vậy để đảm bảo vaccin có hiệu quả bảo hộ tốt thì giống virus DTHCP được chọn để sản xuất vaccin tốt nhất là các chủng được phân lập từ các ổ dịch hoặc ít nhất virus DTHCP cũng phải cùng genotype với virus lưu hành (Vincent T., 2019).

Khả năng nhân lên của virus chủng I177L trên tế bào BMC và PBMC đã được chứng minh (Borca *et al.*, 2019). Nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy virus có khả năng nhân lên tốt trên môi trường tế bào PBMC và BMC và ổn định sau mỗi đời cấy chuyển. Hiệu giá virus đạt được biến động từ $10^6 - 10^{6.5}$ HAD₅₀. Ở ngưỡng hiệu giá này, khả năng nhân lên của virus DTHCP chủng I177L không khác nhiều nếu so sánh với virus chủng cường độc.

Tính an toàn và khả năng kích thích tạo đáp ứng miễn dịch đặc hiệu là những tiêu chí quan trọng trong việc lựa chọn chủng vi sinh vật dùng làm giống sản xuất vaccin. Kết quả thử trên heo ở các nồng độ khác nhau cho thấy chủng I177L an toàn khi tiêm cho heo. Thực tế khi tiêm cho heo ở các nồng độ $10^4 - 10^6$ HAD₅₀ heo vẫn biểu hiện ăn uống, vận động và phát triển

bình thường. Thực vậy, khi tiêm vaccin nhược độc cho động vật hoặc tiêm virus đã làm giảm độc vào cơ thể có thể được coi là quá trình gây nhiễm nhân tạo có kiểm soát và giống như một phản ứng sinh học tất yếu, có tính chất cá thể, một số động vật có thể có phản ứng thân nhiệt ở mức độ kiểm soát. Trong thực tế, hiện tượng này cũng thường gặp khi cơ thể phản ứng lại với một protein lạ được đưa vào cơ thể.

Khả năng bài thải của virus DTHCP nhược độc chủng I177L sau khi tiêm cho heo cũng được nghiên cứu đánh giá. Theo dõi sau khi tiêm, hiện tượng bài virus chứng minh bằng sự hiện diện của virus chủng I177L trong dịch mũi của heo. Tuy nhiên thời gian bài virus ngắn chỉ trong khoảng tuần đầu (5-7 ngày sau tiêm virus) và sau đó virus đã không phát hiện trong dịch mũi của heo ở các ngày 14, 21, 27. Hiện tượng bài thải của virus qua dịch mũi không phải là trường hợp cá biệt đối với virus DTHCP chủng I177L, khả năng này chúng ta có thể thấy ở một số vaccin virus nhược độc khác dùng phòng bệnh cho gia súc và gia cầm. Tuy nhiên thời gian bài virus thường không kéo dài và tính chất này chứng minh khả năng nhân lên có giới hạn hay có kiểm soát của virus DTHCP chủng I177L khi đưa vào cơ thể.

Nghiên cứu của Borca *et al.* (2019) chỉ ra rằng mức độ nhiễm virus huyết biểu hiện bằng hiệu giá virus (HAD_{50}) gây ra do chủng cường độc gấp từ 100 – 10.000 lần so sánh với virus DTHCP chủng I177L. Heo được tiêm với virus DTHCP chủng G-AFS cường độc có mức độ nhiễm virus huyết xác định được ở ngày thứ 4 là $10^{7.5} HAD_{50}$ và tăng lên ở ngày 7 là $10^{8.8} HAD_{50}$. Ngược lại với chủng cường độc, virus DTHCP chủng I177L có mức độ nhiễm thấp hơn $10^{1.8} - 10^5 HAD_{50}$ ở ngày 4 và đạt đỉnh $10^4 - 10^{7.5}$ ở ngày 11, sau đó giảm xuống ở ngày 28 ($10^{2.3} - 10^4 HAD_{50}$). Nghiên cứu của chúng tôi khá tương đồng với kết quả thu được của Borca *et al.* (2019). Ở ngày 7 sau khi nhiễm virus I177L, kiểm tra 25 mẫu máu heo có 12/25 mẫu có sự hiện diện của virus DTHCP chủng I177L (bảng 3). Phân tích 12 mẫu máu dương tính ở ngày 7,

có 10/12 mẫu (83,3%) có hiệu giá virus trong khoảng từ $10^{3.0} - 10^{4.7} HAD_{50}$ và 2/12 (16,7%) mẫu có hiệu giá trong dãy $10^{5.0} - 10^{6.3} HAD_{50}$. Hiệu giá virus có xu hướng tăng ở ngày 14, với 8/14 (57,1%) mẫu có hiệu giá từ $10^{5.6} - 10^{6.9} HAD_{50}$ (so sánh chỉ có 16,7% khi kiểm tra ở ngày 7) và 6/14 (42,9%) mẫu hiệu giá từ $10^{2.8} - 10^{4.7} HAD_{50}$. Hiệu giá virus giảm sâu khi kiểm tra mẫu máu ở ngày 21 và thấp hơn so sánh với kết quả nghiên cứu của Borca *et al.* (2019) ở thời điểm kiểm tra 28 ngày, với kết quả 100% mẫu dương có hiệu giá virus trong dãy $10^{1.3} - 10^3 HAD_{50}$ (Số liệu không trình bày tại báo cáo này). Hiện tượng này chứng tỏ virus vẫn có khả năng nhân lên và xâm nhập vào máu gây hiện tượng virus huyết, nhưng mức độ nhân lên có giới hạn và không gây bệnh cho heo được tiêm; heo an toàn, sống khỏe mạnh, hoạt động phát triển bình thường.

Khả năng đáp ứng kháng thể và mức độ bảo hộ của heo sau khi gây miễn dịch bằng virus DTHCP chủng I177L cũng đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy virus DTHCP tạo đáp ứng miễn dịch tốt. Ở ngày 14 sau khi tiêm vaccin, heo ở một số nồng độ đã có thể phát hiện được kháng thể DTHCP bằng phương pháp ELISA. Tỷ lệ heo ở các nồng độ có huyết thanh chuyên dương tăng dần khi kiểm tra ở các ngày 21 và 28 sau tiêm. Kết quả nghiên cứu của Borca *et al.* (2019) về đáp ứng kháng thể trên heo khi được tiêm virus DTHCP chủng I177L cho thấy lớp kháng thể IgM và IgG có thể phát hiện được trong huyết thanh ở tất cả heo tiêm với các liều khác nhau bằng phương pháp ELISA với kháng nguyên tự chế và ở ngày 14 đáp ứng kháng thể đối với hai loại kháng thể này đạt ngưỡng cực đại ở tất cả các nhóm heo. Lớp kháng thể IgM không còn hiện diện trong huyết thanh khi kiểm tra ở ngày 21, trong khi lớp kháng thể IgG còn duy trì ở mức độ cao đến ngày 28.

Đánh giá khả năng bảo hộ sau tiêm chủng virus DTHCP I177L trên heo bằng phương pháp thử thách cường độ chứng minh tính tương đồng kháng nguyên bảo hộ của virus DTHCP chủng I177L với chủng virus DTHCP cường độc

phân lập tại Việt Nam. Kết quả cũng chứng minh chủng virus I177L có khả năng tạo miễn dịch mạnh, biểu hiện có khả năng bảo hộ heo chống lại virus DTHCP cường độc với liều gây chết ở liều gây miễn dịch thấp, 10^2 HAD₅₀ (100% heo sống sau công). Cụ thể, loại trừ liều 10^1 HAD₅₀ chỉ có 2/5 heo sống sau khi công độc, còn lại tất cả các nồng độ khác (10^2 , 10^3 , 10^4 HAD₅₀) đều sống khỏe mạnh sau công trong thời gian theo dõi 21 ngày. Kết quả công độc cũng như các nghiên cứu đánh giá hiệu lực vacxin thực hiện tại đề tài này cho thấy tính ổn định về độc lực của virus DTHCP cường độc dùng công, và liều công chọn 10^2 HAD₅₀ là hoàn toàn chính xác. Kết quả cũng chứng tỏ chủng virus I177L không những có khả năng kích thích sinh miễn dịch bảo hộ cho heo khi công đồng chủng (Borca *et al.*, 2019), mà có khả năng bảo vệ heo chống lại virus DTHCP cường độc lưu hành tại Việt Nam (dị chủng). Hay nói một cách khác virus DTHCP chủng I177L có tính tương đồng kháng nguyên với chủng virus DTHCP cường độc phân lập tại Việt Nam. Kết quả kiểm tra virus trong dịch mũi và máu của các heo gây miễn dịch bằng virus DTHCP chủng I177L sau khi công cường độc ở ngày 20 cho thấy heo miễn dịch được bảo hộ và trạng thái miễn dịch vô trùng.

Từ kết quả nghiên cứu trình bày ở trên, chúng tôi có nhận xét: i/ Virus DTHCP chủng G-delta-I177L có tính tương đồng kháng nguyên với virus DTHCP gây bệnh cho đàn heo nuôi tại Việt Nam, hay nói cách khác heo gây miễn dịch với chủng virus DTHCP chủng G-delta-I177L có khả năng bảo hộ heo chống lại virus DTHCP có độc cao lưu hành tại Việt Nam; ii/ Có thể sử dụng virus DTHCP chủng G-delta-I177L để sản xuất vacxin phòng bệnh DTHCP cho đàn heo nuôi tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Angel L. Carrascosa, M. Jose Bustos and Patricia de Leon, 2011. Methods for growing and titrating African swine fever virus: field and laboratory samples. *Current Protocols in Cell Biology* 53: 26.14.1-26.14.25.
2. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2019. *Báo cáo tình hình công tác phòng chống bệnh dịch tả heo châu Phi*. Tài liệu hội nghị bàn về các giải pháp phòng chống dịch tả heo châu Phi ngày 9/7/2019.
3. CSIRO Australian Animal Health Laboratory (AAHL), 2018. *Porcine bone marrow harvest*.
4. European Union Reference Laboratory for African Swine Fever (ASF) (<https://asf-referencelab.info/asf>). <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/670109v2.full>
5. Javier M.Rodrigue, Leticia Tais Moreno, Ali Alejo, Anna Lacasta, Fernando Rodriguez, Maria L. Salas, 2015. Genome sequence of African swine fever virus BA71, the virulent parent strain of the nonpathogenic and tissue culture adapted BA71V. *PLoS One*.
6. Manuel V.Borca, Elizaberth Ramirez Medina, Ediane Silva, Elizaberth Vuono, Ayushi Rai, Sarah Pruitt, Lauren G. Holinka, Lauro velazquez Salinas, James Shu and Douglas P.Gladue, 2019. Development of a highly effective African swine fever virus vaccine by detection of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic Eurasia strain. <https://www.researchgate.net/publication/337715368>.
7. Manuel V.Borca, Lauren G.Holinka, Keith A.Berggren & Douglas P.Gladue, 2017. CRISPR-Cas9, a tool to efficiently increase the development of recombinant African swine fever viruses. *Scientific reports*, Vol 8:3154.
8. Natasha N.Gaudreault and Juergen A. Richt, 2019. Subunit vaccine approaches for African swine fever virus. *Journal of virology*. Vol 6, No 56.
9. Paula L. Monteagudo, Anna Lacasta, Elisabeth López, Laia Bosch, Javier Collado, Sonia Pina-Pedrero, Florencia Correa-Fiz, Francesc Accensi, Maria Jesús Navas, Enric Vidal, María J.Bustos, Javier M.Rodríguez,

- Andreas Gallei, Veljko Nikolin, María L.Salas, Fernando Rodríguez, 2017. BA71ΔCD2: A new recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective capabilities. *Journal of virology*. Vol 91, Issue 21.
10. Peter W.Krug, Lauren G.Holinka, Vivian O'Donnell, Bo Reese, Brenton Sanford, Ignacio Fernandez-Sainz, Douglas P.Gladue, Jonathan Arzt, Luis Rodriguez, Guillermo R.Risatti, Manuel V.Borca, 2015. The progressive adaptation of a Georgian isolate of African swine fever virus to vero cells lead to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome. *Journal of virology*, Vol.89; No 4.
11. R.souto, Mutowembwa, J.Van Heerden, G.T Fosgate, L.Heath and W. Voslo, 2014. Vaccine potential of two previously uncharacterized African swine fever virus isolates from Southern Africa and heterologous cross protection of an avirulent European isolate. *Transboundary and Emerging Diseases*. 63 (2016) 224-231.
12. Reed, L. J. and Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, 27, 493-497.
13. SOP/cisa/asf/vi/1(2018). Procedure for african swine fever virus (asfv) isolation on porcine leucocytes and hemadsorption test. (<https://asf-referencelab.info/asf>).
14. Vincent Ter Beek, 2019. Sterile immunity possible against ASFv, US scientists say. <https://www.pigprogress.net/Health/Articles/2019/>.
15. Vivian O'Donnell, Guillermo R.Risatti, Lauren G.Holinka, Peter W.Krug, Jolene Carlson, Lauro Velazquez-Salinas, Paul A.Azzinaro, Douglas P.Gladue, Manuel V.Borca., 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. *Journal of virology*. Vol.91, issue 1.
16. Vivian O'donnell, Lauren G. Holinka, Douglas P.Gladue, Brenton Sanford, Peter W.Krug, Xiqiang Lu, Jonathan Arzt, Bo Reese, Consuela Carrillo, Guillermo R.Risatti, Manuel V.Borca., 2015. African swine fever virus Georgia isolate harboring deletion of MGF360 and MGF505 genes is attenuated in swine and confers protection against challenge with virulent parental virus. *Journal of Virology*, Volume 89, Number 11.
- Ngày nhận 26-3-2021
Ngày phản biện 27-4-2021
Ngày đăng 1-9-2021