

MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA VIRUS DỊCH TẢ LỢN NHƯỢC ĐỘC CHŨNG C ĐƯỢC THÍCH NGHI TRÊN TẾ BÀO PK15 TẠI CÔNG TY HANVET

*Trần Văn Khánh, Nguyễn Thanh Ba, Nguyễn Thu Trang,
Nguyễn Văn Tâm, Nguyễn Văn Phúc, Nguyễn Thị Bích, Nguyễn Hữu Vũ
Công ty Cổ phần Dược và Vật tư thú y (Hanvet)*

TÓM TẮT

Virus nhược độc dịch tả lợn, chủng C đã được thích nghi trên tế bào PK15 tại công ty Hanvet. Sau khi thích nghi, virus đã được kiểm tra các đặc tính sinh học của giống. Kết quả kiểm tra cho thấy chủng virus đạt các tiêu chuẩn về nhận dạng, thuần khiết. Đường cong sinh trưởng của virus trên tế bào ổn định, hiệu giá virus cao nhất đạt $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml tại 72 giờ sau khi gây nhiễm. Chủng virus thích nghi trên tế bào vẫn giữ được đặc tính gây sốt thỏ, liều gây nhiễm tối thiểu trên thỏ là 10^{-5} /ml. Virus an toàn khi tiêm cho lợn với liều $10^{6.5}$ TCID₅₀/lợn. Gây miễn dịch cho lợn bằng chủng virus dịch tả lợn thích nghi trên tế bào với các liều miễn dịch 10^1 , 10^2 , 10^3 và 10^4 TCID₅₀, lợn đều có đáp ứng miễn dịch tốt và được bảo vệ hoàn toàn khi thử thách với 10^3 MLD₅₀ virus dịch tả lợn cường độc.

Từ khóa: virus nhược độc, dịch tả lợn, đặc tính sinh học, đáp ứng miễn dịch.

Characteristics of attenuated classical swine fever virus - C strain adapted on PK15 cell line at Hanvet company

*Tran Van Khanh, Nguyen Thanh Ba, Nguyen Thu Trang,
Nguyen Van Tam, Nguyen Van Phuc, Nguyen Thi Bích, Nguyen Huu Vu*

Classical swine fever virus, C strain was adapted on PK15 cell line at Hanvet Company. The biological characteristics of cell-adapted virus showed that its identity and purity met the required standards. The growth kinetic of virus was very stable, the highest viral titer was $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml at 72h post-infection. The cell-adapted virus retained the ability to induce fever in the experimental rabbits; the minimum infective dose in the experimental rabbits was 10^{-5} /ml. The pigs were safe when inoculation with dose of $10^{6.5}$ TCID₅₀/pig. The inoculated pigs with 10^1 ; 10^2 ; 10^3 and 10^4 TCID₅₀ of cell-adapted virus induced good immune response and they were completely protected when challenging with 10^3 MLD₅₀ virulent CSFV.

Keywords: attenuated virus, classical swine fever, biological characteristics, immune response.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vaccin dịch tả lợn (DTL) là một vaccin rất quan trọng trong việc phòng bệnh cho đàn lợn. Vaccin phòng bệnh DTL cho lợn hiện nay được sản xuất trên hai phương thức chính là sản xuất vaccin từ hạch lách thỏ và sản xuất vaccin trên tế bào.

Tại Hanvet, chúng tôi đã có quy trình sản xuất vaccin DTL qua thỏ và sản phẩm đã được phân phối trên thị trường. Tuy nhiên, việc sản xuất vaccin DTL trên thỏ gặp nhiều khó khăn do:

- Vaccin có chứa nhiều protein ngoại lai
- Dễ tạp nhiễm các vi sinh vật có nguồn gốc từ thỏ

- Chất lượng thỏ dùng cho sản xuất khó kiểm soát
- Có thể gây phản ứng quá mẫn
- Khó mở rộng quy mô sản xuất
- Hàm lượng virus không cao.

Vaccin sản xuất trên tế bào là một công nghệ mới với nhiều ưu điểm như:

- Vaccin đảm bảo độ tinh khiết
- Các nguyên liệu đầu vào của quá trình sản xuất dễ kiểm soát
- Quá trình sản xuất cần ít diện tích mặt bằng hơn sản xuất vaccin trên thỏ

- Giảm tiêu tốn nhân lực trong quá trình sản xuất
- Dễ dàng nâng cao quy mô sản xuất
- Hiệu quả sản xuất cao, giá thành hạ
- Chất lượng vacxin được kiểm soát dễ dàng

Vi vậy, việc chuyển sang nghiên cứu sản xuất vacxin trên tế bào là một điều tất yếu.

Từ thực tiễn, chúng tôi đã tiến hành thích nghi virus DTL nhược độc chủng C trên nhiều loại tế bào khác nhau: tế bào PK15, tế bào tinh hoàn lợn (ST cell line) và tế bào tinh hoàn bê (BT cell line) để tạo chủng virus dùng cho sản xuất vacxin trên tế bào. Kết quả đã tạo được một chủng virus DTL thích nghi trên tế bào PK15.

Nghiên cứu này nhằm xác định các đặc tính sinh học của virus DTL nhược độc chủng C được thích nghi trên tế bào PK15 tại công ty Hanvet.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Tên môi	Trình tự môi	Sản phẩm (bp)
CFSVF	AACATGGATGGTGTAACTGGT	343
CFSVR	TTCTCTATAGTGTGGTCATTCC	

Lợn khỏe mạnh trên 2 tháng tuổi, có huyết thanh âm tính với kháng thể DTL được sử dụng trong nghiên cứu.

Thỏ mẫn cảm khỏe mạnh, khối lượng 1,8 – 2,2kg, có thân nhiệt bình thường trong 3 ngày liên tiếp, lợn lai hướng nạc hai tháng tuổi, chưa tiêm phòng vacxin DTL và có huyết thanh âm tính với virus DTL khi xét nghiệm bằng ELISA được sử dụng trong nghiên cứu.

Tế bào dòng PK15 (ATCC-CCL33) được nuôi cấy giữ giống tại Công ty Hanvet và các loại môi trường hóa chất cho nuôi cấy tế bào như MEM, PBS(-)... cũng được sử dụng trong nghiên cứu.

Virus DTL cường độc phân lập tại thực địa được giữ giống tại công ty Hanvet có liều MLD đạt 10^5 /ml.

2.3.2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng trong nghiên cứu này là Virus DTL nhược độc qua thỏ chủng C đã được thích nghi trên tế bào PK15, hiệu giá virus đạt $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml.

2.2. Nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu tiến hành theo các nội dung sau:

Nhận dạng virus thông qua xác định sự có mặt của gen E2

Kiểm tra thuần khiết

Tính cảm nhiễm của chủng virus trên thỏ

Tính cảm nhiễm của virus trên tế bào

Tính an toàn của virus trên lợn

Tính sinh miễn dịch của virus trên lợn.

2.3. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Vật liệu nghiên cứu

Cặp môi nhận dạng gen E2 của virus DTL được sử dụng trong nghiên cứu (Yan Li & cs, 2007):

Kỹ thuật RT-PCR được sử dụng để nhận dạng virus DTL theo hướng dẫn của Yan Li & cs (2007).

Kiểm tra thuần khiết được tiến hành theo TCVN 8684:2011

Tính mẫn cảm trên thỏ của virus DTL được đánh giá thông qua phản ứng thân nhiệt của thỏ khi tiêm virus DTL theo hướng dẫn trong TCVN 8685-8:2011

Kỹ thuật Fluorescent Antibody Test (FAT) được sử dụng để xác định hiệu giá virus DTL trên tế bào, thực hiện theo hướng dẫn trong OIE Terrestrial Manual 2014, chapter 2.8.3.

Kỹ thuật ELISA với bộ kit của hãng IDEXX và kỹ thuật trung hòa virus NPLA (Neutralising Peroxidase Linked Assay) theo hướng dẫn trong TCVN 5273:2010 được áp dụng.

Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học, sử dụng phần mềm Minitab16.

2.3.3. Bố trí thí nghiệm

Để xác định tính cảm nhiễm của virus trên thỏ, hỗn dịch virus DTL được pha loãng theo cơ số 10, dịch virus tại các độ pha loãng 10^{-2} - 10^{-6} được tiêm cho thỏ, mỗi độ pha loãng tiêm cho 5 thỏ, 1ml/con theo đường tĩnh mạch tai. Sau khi tiêm 24 giờ, tiến hành đo thân nhiệt thỏ 6 giờ một lần đến 120 giờ.

27 chai T-flask 75cm² tế bào PK15 một lớp được gây nhiễm virus với liều gây nhiễm MOI = 0,01. Sau khi gây nhiễm virus, tại các thời điểm 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 giờ, thu 3 chai tế bào nhiễm chuyển vào tủ lạnh -40°C, đông tan 3 lần rồi lấy mẫu để chuẩn độ hiệu giá virus tại các thời điểm thu hoạch để xây dựng đường cong sinh trưởng.

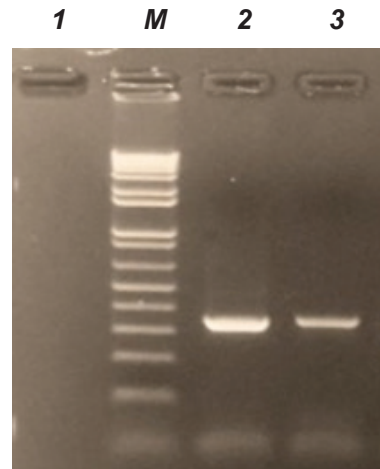
Để xác định tính an toàn của virus dịch tả lợn, 20 lợn thí nghiệm chia thành 4 nhóm được tiêm virus nhược độc với liều từ 10^5 , 10^6 và $10^{6,5}$ TCID₅₀/lợn, một nhóm không tiêm làm đối chứng. Lợn được theo dõi 15 ngày sau khi tiêm virus về các chỉ tiêu, phản ứng cục bộ tại vị trí tiêm, các biểu hiện lâm sàng và thân nhiệt.

Để đánh giá tính sinh miễn dịch, 25 lợn thí nghiệm được chia thành 5 nhóm, mỗi nhóm 5 con. Từ nhóm 1 đến nhóm 4, lợn được gây miễn dịch bằng virus DTL nhược độc đã thích nghi trên tế bào với các liều 10^1 ; 10^2 ; 10^3 ; 10^4 TCID₅₀/con. Nhóm 5 không tiêm virus làm đối chứng. Tại các thời điểm 14, 21, 28 và 35 ngày sau khi gây miễn dịch, lợn được lấy máu để kiểm tra kháng thể bằng ELISA và NPLA. Sau 35 ngày miễn dịch, lợn được công cường độc bằng chủng virus DTL cường độc với liều 10^3 MLD. Lợn chết được mổ khám để kiểm tra bệnh tích.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả nhận dạng gen E2

RNA của mẫu dịch virus được tách chiết bằng TRIzolTM Reagent (hãng Invitrogen). Cặp mồi đặc hiệu CSFVF, CSFVR được sử dụng để nhận diện vùng gen E2 của virus dịch tả lợn trong phản ứng PCR. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch Agarose 1%. Kết quả điện di được thể hiện trên hình 1.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR của mẫu dịch virus DTL nhược độc với cặp mồi đặc hiệu CSFV

Giếng M: Marker 100bp plus (invitrogen); giếng 1: Đối chứng âm; giếng 2: Đối chứng dương; giếng 3: Sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu CSFVF – CSFVR

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy hình ảnh của các băng rõ ràng, băng đơn gọn, kích thước băng của mẫu dịch virus DTL nhược độc có kích thước bằng với kích thước của băng của mẫu đối chứng dương. Trong khi đó, đối với giếng đối chứng âm không xuất hiện băng sáng. Kết quả này khẳng định virus được thích nghi trên tế bào PK15 là virus DTL.

3.2. Kết quả kiểm tra thuần khiết virus DTL

Dịch virus DTL nhược độc được kiểm tra vô trùng và tạp nhiễm *Mycoplasma* theo TCVN 8684:2011, kết quả như sau:

Sau 7 ngày theo dõi các ống môi trường kiểm tra, không thấy sự có mặt của vi khuẩn trong môi trường dinh dưỡng. Màu môi trường không đổi, không vẩn đục.

Sau 14 ngày theo dõi các ống kiểm tra sự tạp nhiễm của nấm, không thấy sự có mặt của các sợi nấm trên bề mặt thạch.

Sau 28 ngày theo dõi các mẫu kiểm tra sự tạp nhiễm *Mycoplasma*, không thấy sự có mặt của *Mycoplasma* trong môi trường dinh dưỡng.

Từ các kết quả trên, mẫu dịch virus DTL nhược độc đạt tiêu chuẩn về vô trùng và không tạp nhiễm *Mycoplasma*.

3.3. Tính cảm nhiễm của virus trên thỏ

Việc thích nghi virus DTL nhược độc chủng C trên tế

bào PK15 có ảnh hưởng tới tính miễn cảm của virus trên thỏ như thế nào? Kết quả thu được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Phản ứng thân nhiệt của thỏ khi tiêm virus DTL nhược độc

STT	Độ pha loãng	Phản ứng thân nhiệt của thỏ					Kết luận
		Thỏ 1	Thỏ 2	Thỏ 3	Thỏ 4	Thỏ 5	
1	10 ⁻²	++	++	++	++	++	+
2	10 ⁻³	++	++	++	++	++	+
3	10 ⁻⁴	++	++	++	++	+	+
4	10 ⁻⁵	++	+	++	++	+	+
5	10 ⁻⁶	-	-	+	-	-	+/-

Ghi chú: “++” thỏ sốt điển hình theo TCVN 8685-8:2011

“+” thỏ sốt nhẹ theo TCVN 8685-8:2011

“+/-” thỏ nghi ngờ theo TCVN 8685-8:2011

“-” thỏ không sốt

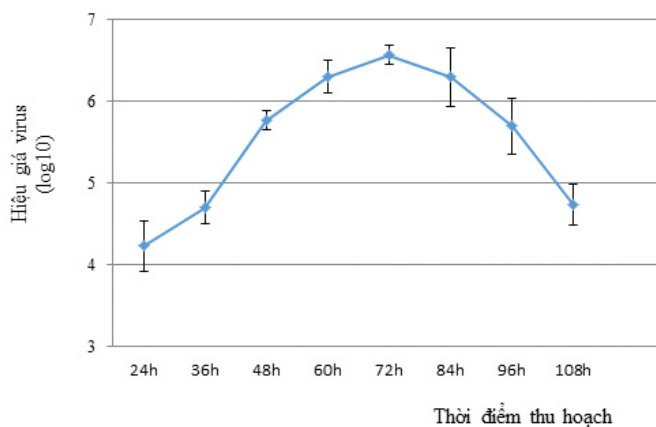
Kết quả thu được cho thấy virus DTL chủng C sau khi thích nghi trên tế bào PK15 vẫn có tính cảm nhiễm rất tốt khi gây nhiễm trên thỏ, khả năng gây nhiễm trên thỏ của virus DTL chủng C thích nghi trên tế bào đạt 10⁵ RID/ml (Rabbit Infected Dose). Kết quả nghiên cứu này tương đồng với kết quả nghiên cứu của các tác giả Chris Morrissy, Trần Xuân Hạnh & cs (2010) khi nghiên cứu phát triển vaccin dịch tả heo mới, cấy chuyển virus DTL chủng C trên tế bào PK15A 12 lần; Chao Tong & cs (2017) khi tiếp truyền liên tục virus DTL chủng C trên tế bào PK15 40 lần; Ferrari (1992) khi nghiên cứu thích nghi virus DTL chủng C trên tế bào MPK sau 20 đời cấy

chuyển, virus DTL chủng C vẫn giữ được độc lực trên thỏ khi thích nghi trên tế bào. Tuy nhiên, dòng tế bào sử dụng trong các nghiên cứu có khác nhau.

Thực tế, kết quả nghiên cứu này khác với kết quả của Nguyễn Tiến Dũng và cs (2005) khi nghiên cứu thích nghi virus DTL chủng C trên tế bào CPK, sau 73 đời cấy chuyển, độc lực trên thỏ của virus không còn ổn định như virus gốc.

3.4. Tính cảm nhiễm của virus trên tế bào

Để xác định đường cong sinh trưởng của virus DTL nhược độc, chúng tôi tiến hành thí nghiệm như mô tả trong mục 2.3.3. Kết quả thu được như sau:



Hình 2. Đường cong sinh trưởng của virus DTL nhược độc

Qua đồ thị sinh trưởng, phát triển của giống virus DTL nhược độc cho thấy: Sau gây nhiễm 24 giờ, virus bắt đầu quá trình nhân lên, hàm lượng virus tăng dần theo thời gian nhiễm và đạt cao nhất $10^{6.57}$ TCID₅₀/ml tại thời điểm 72 giờ sau gây nhiễm. Sau thời điểm 84 giờ, hiệu giá virus giảm nhanh chóng. Đến thời điểm 108 giờ sau gây nhiễm, hiệu giá virus chỉ còn $10^{4.73}$ TCID₅₀/ml.

Có sự khác biệt về động thái sinh trưởng của virus DTL trên tế bào trong nghiên cứu này với nghiên cứu của Chao Tong & cs. Trong

nghiên cứu của Chao Tong & cs, hiệu giá virus đạt cao nhất tại thời điểm 96 giờ sau gây nhiễm và tác giả không theo dõi tiếp giai đoạn sau. Sự khác biệt này có thể do liều nhân nhiễm virus (MOI) trong hai nghiên cứu có sự khác nhau. Chao Tong & cs sử dụng liều nhân nhiễm MOI = 0.001, trong khi nghiên cứu này sử dụng MOI = 0.01.

3.5. Tính an toàn của virus trên lợn

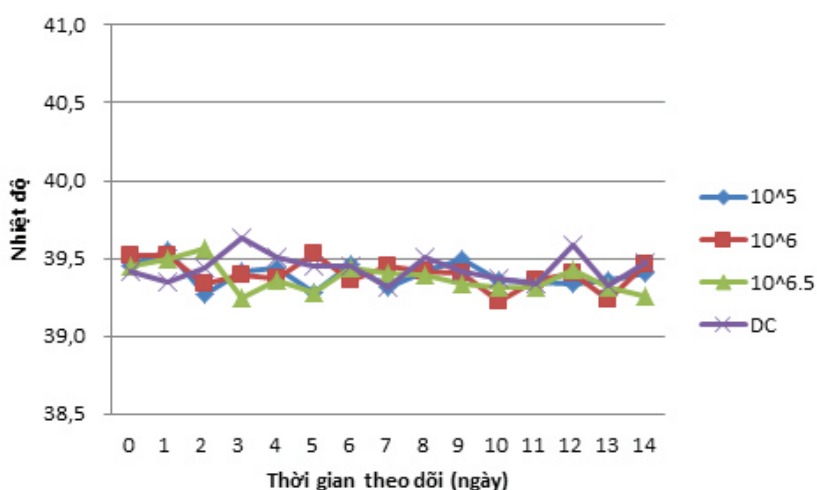
Tính an toàn của virus DTL nhược độc được đánh giá thông qua thí nghiệm đã được mô tả trong mục 2.3.3. Kết quả chúng tôi thu được như sau:

Bảng 2. Biểu hiện lâm sàng của lợn sau khi tiêm virus DTL nhược độc

Chỉ tiêu theo dõi	Số lợn có phản ứng trên các liều tiêm			Đối chứng
	10^5 TCID ₅₀	10^6 TCID ₅₀	$10^{6.5}$ TCID ₅₀	
Phản ứng quá mẫn, sốc phản vệ	0/5	0/5	0/5	0/5
Phản ứng tại vị trí tiêm	0/5	0/5	0/5	0/5
Giảm ăn, bỏ ăn	0/5	0/5	0/5	0/5
Ủ rũ, mệt mỏi	0/5	0/5	0/5	0/5
Tiêu chảy	0/5	0/5	0/5	0/5
Các phản ứng khác	0/5	0/5	0/5	0/5

Như vậy, không phát hiện được phản ứng bất lợi nào xảy ra trên cơ thể lợn ở tất cả các lợn thử nghiệm.

Cùng với theo dõi lâm sàng, đã tiến hành theo dõi thân nhiệt lợn thí nghiệm 2 lần/ngày vào sáng và chiều, kết quả thu được thể hiện qua hình 3.



Hình 3. Thân nhiệt của lợn khi tiêm virus DTL nhược độc với các liều khác nhau

Qua đồ thị thân nhiệt của lợn thí nghiệm cho thấy, tất cả lợn trong thử nghiệm đều có thân nhiệt bình thường, dao động trong khoảng 39,2 – 39,6°C, không có hiện tượng sốt trong suốt quá trình theo dõi. Nói cách khác, virus DTL nhược độc không gây sốt cho lợn được tiêm.

Để đánh giá toàn diện hơn về tính an toàn của virus DTL nhược độc, chúng tôi đã tiến hành theo dõi tăng trọng của lợn trong quá trình thí nghiệm để so sánh với lợn đối chứng. Kết quả thể hiện qua bảng 3.

Bảng 3. Tăng trọng của lợn khi tiêm virus DTL nhược độc ở các liều khác nhau

Nhóm TN	Khối lượng lợn (kg)		Tỷ lệ tăng trọng (%)
	Ngày 0	Ngày 14	
10 ⁵ TCID ₅₀	21,9 ± 0,2	28,72 ± 0,11	31,14
10 ⁶ TCID ₅₀	23,71 ± 0,19	30,37 ± 0,25	28,10
10 ^{6,5} TCID ₅₀	22,87 ± 0,12	30,23 ± 0,17	32,18
Đối chứng (không tiêm)	22,69 ± 0,18	29,87 ± 0,15	31,64

Từ bảng số liệu theo dõi tăng trọng của lợn, sử dụng thuật toán thống kê phân tích phương sai một nhân tố cho thấy, không có sự khác biệt có ý nghĩa về khả năng tăng trọng giữa các nhóm lợn thí nghiệm.

Từ các kết quả kiểm tra an toàn của giống virus DTL nhược độc cho thấy virus DTL nhược độc an toàn cho lợn khi tiêm với liều 10^{6,5} TCID₅₀.

Kết quả này hoàn toàn dễ hiểu vì chủng virus dùng để thích nghi trên tế bào là virus DTL chủng C, một chủng virus cực kỳ an toàn, đã được chứng

minh qua nửa thế kỷ (Qui Hua – Ji & cs, 2006).

3.6. Tính sinh miễn dịch của virus trên lợn

3.6.1. Đáp ứng miễn dịch dịch thể

Biến động kháng thể trong huyết thanh lợn khi xác định bằng ELISA

Sau khi miễn dịch cho lợn theo bố trí đã mô tả trong mục 2.3.3, tiến hành lấy máu, chất huyết thanh lợn tại các thời điểm khác nhau và thực hiện phản ứng ELISA. Kết quả thu được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Biến động kháng thể của lợn được tiêm virus DTL nhược độc xác định bằng ELISA

Liều tiêm	% blocking/ngày lấy máu					
	D0	D7	D14	D21	D28	D35
10 ¹ TCID ₅₀	11,580	23,580	39,580	53,080	62,280	67,060
10 ² TCID ₅₀	19,780	29,520	45,380	57,000	71,800	78,340
10 ³ TCID ₅₀	29,920	42,180	53,560	61,600	69,740	78,980
10 ⁴ TCID ₅₀	19,000	33,360	55,000	69,980	73,720	78,880
Đối chứng (không tiêm)	20,220	15,120	15,880	8,800	9,360	8,080

Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở các liều tiêm 10¹, 10², 10³, 10⁴, lợn đều có đáp ứng miễn dịch tốt. Sau khi tiêm virus DTL nhược độc 14 ngày, lợn bắt đầu có kháng thể trong máu. Hàm lượng

kháng thể tăng dần và đạt hàm lượng cao nhất tại thời điểm 35 ngày sau khi miễn dịch.

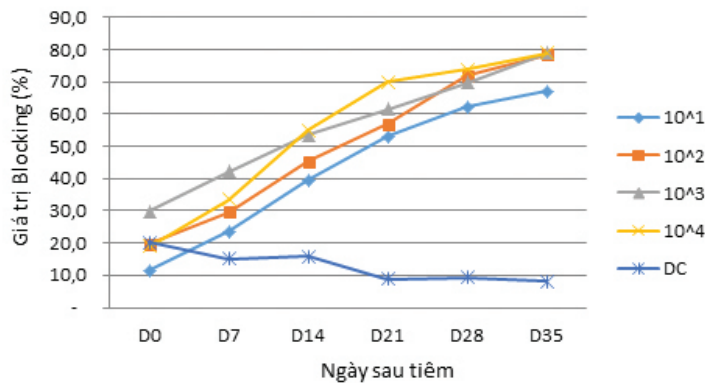
Có sự khác biệt trong đáp ứng miễn dịch của lợn được tiêm với các liều virus khác nhau. Ở liều

miễn dịch 10^1 TCID₅₀/ml, lợn có đáp ứng miễn dịch yếu hơn, sự xuất hiện kháng thể muộn hơn và hàm lượng kháng thể trong máu cũng thấp hơn so với các liều tiêm khác. Trong khi đó lợn được tiêm miễn dịch ở các liều 10^2 , 10^3 , 10^4 TCID₅₀ có đáp ứng miễn dịch cao tương đương nhau. Tại thời điểm 35 ngày sau miễn dịch, kháng thể trong máu lợn miễn dịch 10^1 có giá trị Blocking đạt 67,1%, trong khi đó ở các liều miễn dịch 10^2 ; 10^3 ; 10^4 TCID₅₀ có giá trị Blocking trung bình lần lượt là: 78,4%, 79,0% và 78,9%. Cả 4 liều miễn dịch thử nghiệm đều chưa có dấu hiệu giảm hàm lượng kháng thể sau 35 ngày miễn dịch. Trong khi đó lô

đối chứng không tiêm, hàm lượng kháng thể luôn âm tính trong suốt quá trình theo dõi.

Kết quả của chúng tôi tương đồng với kết quả của Chris Morrissy, Trần Xuân Hạnh (2010) khi xác định hiệu lực của vaccin DTL chủng C thích nghi trên tế bào PK15A; Sara Munoz-Gonzalez & cs (2015) khi nghiên cứu về hiệu quả của vaccin nhược độc trong sự đề kháng với virus DTL cường độc ở lợn con.

Biến động kháng thể của lợn được tiêm virus DTL nhược độc thể hiện qua hình 4.



Hình 4. Biến động kháng thể của lợn được tiêm virus DTL tế bào, xác định bằng ELISA

Biến động kháng thể trung hòa cùng với việc xác định kháng thể của lợn bằng ELISA, chúng tôi còn

xác định hiệu giá kháng thể của lợn bằng phản ứng trung hòa trên tế bào. Kết quả thể hiện qua bảng 5.

Bảng 5. Hiệu giá kháng thể trung hòa của lợn được tiêm virus DTL nhược độc

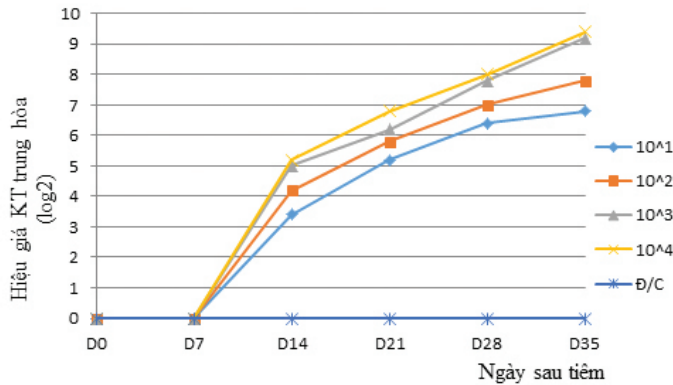
Liều tiêm	Hiệu giá kháng thể trung hòa/ngày lấy máu (Log ₂)					
	D0	D7	D14	D21	D28	D35
10 ¹ TCID ₅₀	0	2	3.4	5.2	6.4	6.8
10 ² TCID ₅₀	0	2.5	4.2	5.8	7	7.8
10 ³ TCID ₅₀	0	2.8	5	6.2	7.8	9.2
10 ⁴ TCID ₅₀	0	2.8	5.2	6.8	8	9.4
Đối chứng (không tiêm)	0	0	0	0	0	0

Qua kết quả theo dõi sự biến động kháng thể trung hòa trong máu lợn thí nghiệm cho thấy: Nhóm lợn được tiêm virus DTL nhược độc có hàm lượng kháng thể trung hòa trong máu tăng

dần theo thời gian, đạt cao nhất sau 35 ngày miễn dịch và chưa có dấu hiệu giảm. Ở liều miễn dịch 10^1 cho hàm lượng kháng thể trung hòa trong máu lợn thấp nhất, liều miễn dịch 10^3 ,

10^4 có hàm lượng kháng thể trung hòa cao tương đối giống nhau. Trong khi đó, lô đối chứng hiệu giá kháng thể giảm dần và gần như bằng 0 sau

21 ngày theo dõi. Hình 5 cho ta thấy rõ biến động hàm lượng kháng thể trung hòa trong máu lợn thí nghiệm.



Hình 5. Biến động kháng thể trung hòa của lợn sau khi tiêm virus DTL trên tế bào

Có sự khác biệt có ý nghĩa trong đáp ứng miễn dịch dịch thể khi miễn dịch cho lợn với liều 10^1 TCID₅₀ so với các liều miễn dịch còn lại ($P < 0,0001$, khi phân tích thống kê với mô hình MIXED trên phần mềm SAS 9.1). Với các liều miễn dịch khác, sự sai khác không có ý nghĩa.

3.6.2. Khả năng bảo hộ khi thử thách với virus cường độc

Để đánh giá một cách hoàn chỉnh về khả năng bảo vệ lợn trước bệnh dịch tả của chủng virus DTL nhược độc, sau 35 ngày theo dõi miễn dịch, chúng tôi đã tiến hành công cường độc cho lợn thí nghiệm và lợn đối chứng, 3 lợn/nhóm miễn dịch và 3 lợn đối chứng được thử thách với cùng 1 liều virus cường độc DTL (10^3 MLD/lợn). Kết quả thu được như sau:

Bảng 6. Biểu hiện lâm sàng của lợn sau khi công cường độc

Biểu hiện lâm sàng	Tỷ lệ biểu hiện lâm sàng				Đối chứng
	Liều miễn dịch (TCID ₅₀)				
	10^1	10^2	10^3	10^4	
Ủ rũ	0/5	0/3	0/3	0/3	3/3
Giảm ăn, bỏ ăn	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3
Tím tái, xuất huyết	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3
Tiêu chảy	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3
Sốt	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3
Chết	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3

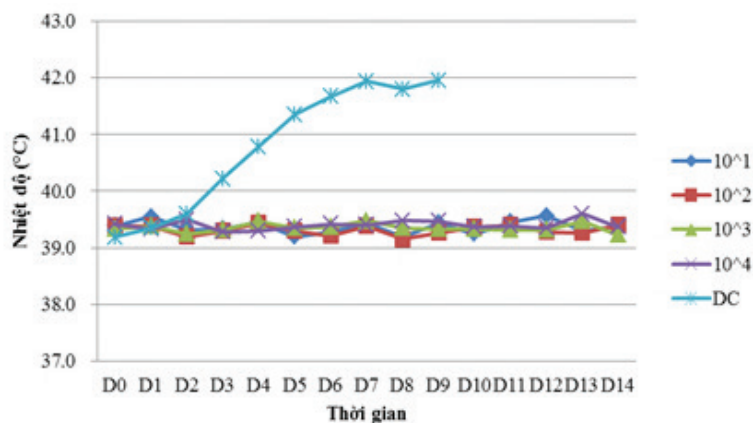
Qua bảng kết quả trên cho thấy: tất cả lợn đối chứng có biểu hiện ủ rũ, bỏ ăn hoặc giảm ăn, tiêu chảy, sốt, xuất huyết dưới vùng da mỏng; 3/3 lợn đối chứng chết với biểu hiện bệnh tích đặc trưng của DTL. Trong khi đó tất cả lợn miễn dịch đều

không có biểu hiện bất thường nào xảy ra.

Thân nhiệt lợn sau khi công cường độc cùng với việc theo dõi các biểu hiện lâm sàng, chúng tôi tiến hành theo dõi thân nhiệt của lợn sau khi công cường độc liên tục trong 10 ngày, mỗi ngày kiểm

tra 2 lần vào 8 giờ sáng và 4 giờ chiều. Thân nhiệt trung bình của lợn được tiêm virus DTL nhược độc và lợn đối chứng có sự khác biệt rõ rệt. Sau khi công cường độc, tất cả lợn được tiêm virus

DTL đều không có hiện tượng sốt, trong khi đó 3/3 lợn đối chứng đều sốt cao, lên tới 42°C và kéo dài liên tục trong 4 ngày, lợn chết ở ngày thứ 5, 8, 10 sau khi công cường độc.



Hình 6. Biến động thân nhiệt lợn thí nghiệm sau khi công cường độc

Kiểm tra virus huyết sau khi công cường độc. Ngoài việc theo dõi các chỉ tiêu lâm sàng, chúng tôi

còn tiến hành lấy máu lợn để phân lập virus trên môi trường tế bào PK15. Kết quả thể hiện qua bảng 7.

Bảng 7. Kết quả phân lập virus DTL trong máu lợn sau khi công cường độc

Lô TN	Tỷ lệ dương tính tại các thời điểm lấy máu				
	3d	5d	7d	10d	14d
10 ¹ TCID ₅₀	0	0	0	0	0
10 ² TCID ₅₀	0	0	0	0	0
10 ³ TCID ₅₀	0	0	0	0	0
10 ⁴ TCID ₅₀	0	0	0	0	0
Đối chứng	3/3	3/3	3/3	3/3	0

Kết quả phân lập virus DTL trong máu lợn thí nghiệm cho thấy: Sau khi công cường độc, không phân lập được virus trong máu của lợn được tiêm virus DTL ở tất cả các liều miễn dịch cũng như tại các thời điểm lấy máu khác nhau.

Ở lợn đối chứng, hiện tượng virus huyết xảy ra ở cả 3/3 lợn (100%), sau đó lợn chết với những triệu chứng, bệnh tích đặc trưng của bệnh DTL.

Để xác định chính xác hơn sự lưu hành của virus DTL trong máu lợn sau khi công cường độc, chúng tôi tiến hành kiểm tra virus huyết bằng kỹ

thuật rRT – PCR. Kết quả được trình bày trong bảng 8.

Kết quả xác định virus huyết bằng rRT-PCR đã khẳng định chắc chắn hơn về khả năng ngăn chặn hiện tượng virus huyết ở lợn được miễn dịch.

Qua những kết quả thu được ở trên cho thấy virus DTL nhược độc chủng C được thích nghi trên tế bào PK15 có tính sinh miễn dịch rất tốt. Khi tiêm cho lợn với liều 10¹TCID₅₀, lợn đã có đáp ứng miễn dịch đủ để bảo vệ lợn trước sự tấn công của virus DTL cường độc.

Bảng 8. Kết quả kiểm tra virus huyết bằng kỹ thuật rRT-PCR

Lô TN	Tỷ lệ dương tính tại các thời điểm lấy máu (%)			
	3d	5d	7d	10d
10 ¹ TCID ₅₀	0	0	0	0
10 ² TCID ₅₀	0	0	0	0
10 ³ TCID ₅₀	0	0	0	0
10 ⁴ TCID ₅₀	0	0	0	0
Đối chứng	100	100	100	100

Theo các tác giả Lai &cs (1982), Biront &cs (1987), Dahle & Liess (1995), de Smit &cs (2001) (dẫn theo Qui Hua – Ji & cs, 2006), virus DTL chủng C sinh đáp ứng miễn dịch rất sớm, chỉ 1 tuần sau khi tiêm vaccin, lợn đã được bảo vệ hoàn toàn. Tuy nhiên trong nghiên

cứu này mới chỉ xác định được khả năng bảo hộ của chủng virus thích nghi trên tế bào sau 35 ngày miễn dịch mà chưa có điều kiện để đánh giá khả năng bảo hộ lợn ở những thời điểm sớm hơn. Vấn đề này cần được đánh giá thêm.

Kết quả kiểm tra bệnh tích giải phẫu lợn thí nghiệm



Hình 7. Bệnh tích của lợn khi công cường độc

Sau khi công cường độc, lợn đối chứng có biểu hiện sốt, bỏ ăn, ủ rũ, xuất huyết ở các vùng da mỏng (bụng, bẹn, gốc tai...). Ở ngày thứ 5, 8, 10 sau khi công, lợn 22, 21, 23 bị chết. Chúng tôi tiến hành mổ khám kiểm tra bệnh tích. Bệnh tích chủ yếu gồm: Xuất huyết dưới da, tích nước xoang bao tim, xuất huyết cơ tim, xuất huyết sụn tiểu thiệt, xuất huyết các hạch lâm ba, van hồi manh tràng loét cục áo...

IV. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi có các kết luận sau:

- Virus DTL nhược độc chủng C thích nghi trên tế bào PK15 tại công ty Hanvet đảm bảo các yêu cầu về nhận dạng, tính thuần khiết, không bị tạp nhiễm các yếu tố ngoại lai.

- Virus nhân lên tốt trên tế bào PK15 với đường cong sinh trưởng ổn định, hiệu giá virus cao nhất đạt $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml tại thời điểm 72 giờ sau khi gây nhiễm virus.

- Sau khi thích nghi trên tế bào PK15, virus dịch tả lợn nhược độc chủng C vẫn giữ được đặc tính gây sốt thỏ, liều cảm nhiễm virus tối thiểu cho thỏ đạt 10^{-5} /ml.

- Virus DTL chủng C thích nghi trên tế bào an toàn khi tiêm cho lợn với liều $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml/lợn.

- Virus DTL chủng C thích nghi trên tế bào PK15 sinh đáp ứng miễn dịch tốt trên lợn. Khi gây miễn dịch cho lợn với liều 10^1 TCID₅₀/ml, lợn được bảo vệ hoàn toàn khi thử thách cường độc tại thời điểm 35 ngày sau miễn dịch.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Tiến Dũng, 2005. Nghiên cứu vaccin Dịch tả lợn và phản ứng miễn dịch sau tiêm phòng. Báo cáo nghiệm thu đề tài khoa học trọng điểm cấp Bộ 2001 – 2003.
2. Nguyễn Tiến Dũng, 2007. Nghiên cứu biện pháp khống chế bệnh Dịch tả lợn ở Việt Nam và xây dựng mô hình an toàn bệnh. Báo cáo nghiệm thu đề tài khoa học trọng điểm cấp Bộ 2004 – 2006.

3. Chris Morrissy, Trần Xuân Hạnh & cs, 2010. Bệnh Dịch tả heo: Phát triển vaccin Dịch tả heo mới. Báo cáo nghiệm thu Dự án 014/07 VIE giữa Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn Việt Nam và Chính phủ Úc.
4. Chao Tong, Ning Chen, Xu Liao, Xuemei Yuan, Mengjiao Sun, Xiao Liang and Weihuan Fang, 2017. Continuous passaging of recombinant C strain virus in PK15 cells selects culture adapted variant that showed enhanced replication but failed to induce fever in rabbits. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, 27(9), 1701 – 1710.
5. Sara Munoz-Gonzales, Marta Perez-Simo, Marta Munoz, Jose Alejandro Bohorquez, Rosa Rosell, Artur Summerfield, Marriano Domingo, Nicolas Ruggli and Lilianee Ganges, 2015. Efficacy of a live attenuated vaccine in classical swine fever virus postnatally persistently infected pigs. *Veterinary research, Bio – Med central*, 2015.
6. Qui Hua – Ji, Shen Rong-xian and Tong Guang-zhi, 2006. The lapinized Chinese strain vaccine against classical swine fever virus: A retrospective review spanning half a century. *Agricultural sciences in China*, 2006.
7. M. Ferrari, 1992. A tissue culture vaccine with lapinized Chinese (LC) strain of Hog cholera virus (HCV). *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* Vol 15, No. 3, pp 221 – 228, 1992.
8. Yan Li, Jian-Jun Zhao, Na Li, Zixue Shi, Dan Cheng, Qing-Hu Zhu, Changchun Tu, Guang-Zhi Tong, Hua-Ji Qiu, 2007. A multiplex nested RT-PCR for the detection and differentiation of wild-type viruses from C-strain vaccine of classical swine fever virus. *Journal of Virological Methods* 143 (2007) 16–22. (Available online at www.sciencedirect.com)

Ngày nhận 5-10-2018

Ngày phản biện 16-12-2018

Ngày đăng 1-3-2019