

QUY TRÌNH NUÔI CẤY DÒNG TẾ BÀO THƯỜNG TRỰC PIPEC ĐỂ GÂY NHIỄM VIRUS VACCIN NHƯỢC ĐỘC DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI CHỦNG ASFV-G-DELTA-I177L/DELTA LVR

Nguyễn Như So¹, Nguyễn Thế Tường¹, Vũ Đăng Đông², Nguyễn Thị Thu Hương², Phạm Thị Hòa², Phạm Thị Hằng², Nguyễn Thị Thanh Nga², Nguyễn Bá Hiên³, Đinh Duy Khang⁴

TÓM TẮT

Bệnh dịch tả lợn châu Phi là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, đã xuất hiện ở Việt Nam từ năm 2019 và gây thiệt hại nặng nề cho ngành chăn nuôi lợn. Thách thức lớn trong sản xuất vaccin dịch tả lợn châu Phi là chưa tìm được dòng tế bào thích ứng cho virus - ứng cử viên vaccin - nhân lên ở quy mô công nghiệp. ASFV-G- Δ I177L/ Δ LVR, một chủng virus ứng viên nhược độc được tạo ra từ việc xoá gen *I177L* và vùng *LVR* đã được nghiên cứu và có khả năng thích ứng trên một dòng tế bào thường trực có nguồn gốc từ lợn rất ổn định là dòng tế bào thường trực PIPEC (Plum Island Porcine Epithelial Cells). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm chuẩn hoá quy trình nuôi cấy tế bào PIPEC (PIPIC – tên thương mại xuất khẩu), gây nhiễm thử nghiệm chủng virus vaccin nhược độc ASFV-G- Δ I177L/ Δ LVR tiến tới nghiên cứu quy trình sản xuất vaccin nhược độc phòng bệnh dịch tả lợn châu Phi cho đàn lợn ở Việt Nam.

Từ khoá: Virus dịch tả lợn châu Phi, vaccin, xoá gen, chủng virus vaccin nhược độc ASFV-G- Δ I177L/ Δ LVR, dòng tế bào PIPEC.

Cultivation of PIPEC continuous cell line for infection with African swine fever attenuated vaccine virus ASFV-G-Delta-I177L/delta LVR strain

Nguyen Nhu So, Nguyen The Tuong, Vu Dang Dong, Nguyen Thi Thu Huong, Pham Thi Hoa, Pham Thi Hang, Nguyen Thi Thanh Nga, Nguyen Ba Hien, Dinh Duy Khang

SUMMARY

African swine fever is a highly dangerous and contagious disease, which has appeared in Viet Nam since 2019 and caused heavy losses for the pig industry. A major challenge in the production of African swine fever vaccines is that there is no a stable, suitable cell line for a vaccine candidate virus to replicate on an industrial scale. ASFV-G-Delta I177L/Delta LVR attenuated candidate vaccine virus strain generated by deleting the *I177L* and *LVR* gene has been investigated, this virus strain has the ability to adapt on a very stable porcine-derived PIPEC cell line (Plum Island Porcine Epithelial Cells). This study was conducted with the aim of standardizing the process of PIPEC cell culture (PIPIC – trade name for export), experimental infection with ASFV-G-Delta I177L/Delta LVR attenuated vaccine strain leading to research on the production process of attenuated vaccines against African swine fever for the pig herd in Viet Nam.

Keywords: African swine fever virus, vaccine, gene deletion, attenuated vaccine virus strain ASFV-G- Δ I177L/ Δ LVR, PIPEC cell line.

¹Tập đoàn DABACO

² Trung tâm Chẩn đoán Thú y DABACO

³ Học viện Nông nghiệp Việt Nam

⁴ Viện Công nghệ sinh học

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ tháng 2 năm 2019, bệnh dịch tả lợn châu Phi xuất hiện trên đàn lợn ở Việt Nam, tạo ra một đợt dịch lớn, lan rộng 63/63 tỉnh thành trong cả nước với hơn 3,3 triệu con lợn bị tiêu hủy. Từ đó tới nay diễn biến của dịch vô cùng phức tạp và vẫn chưa có dấu hiệu dừng lại. Gần đây nhất, ngày 13/9/2021, dịch tái bùng phát tại 4 huyện của tỉnh Đắk Nông làm tiêu hủy nhiều đàn lợn (báo Dân Trí 14/9/2021).

Dù đã xuất hiện được hơn 100 năm, nhưng bệnh dịch tả lợn châu Phi vẫn chưa được khống chế do tính chất phức tạp của mầm bệnh, nhiều đặc điểm dịch tễ chưa được khám phá. Cho đến thời điểm hiện tại, vẫn chưa có vaccin thương mại để phòng bệnh được công nhận. Khó khăn chung trong việc phát triển được vaccin có hiệu lực là do ASFV mã hóa rất nhiều loại protein tác động trực tiếp tới hệ miễn dịch của vật chủ, giúp virus lẩn tránh hệ miễn dịch, đồng thời chưa tìm ra được một dòng tế bào thích ứng và ổn định để nhân virus với một số lượng lớn.

Gần đây, Borca và cs. (2020) đã nghiên cứu và tạo ra một số ứng cử viên vaccin tiên tiến nhất là các chủng ASFV nhược độc (ASFV-G- Δ I177L) được phát triển bằng cách sử dụng chủng virus độc lực ASFV-G xóa gen *I177L* (chủng ASFV-G là chủng virus độc lực cao gây ra đại dịch ở Georgia). ASFV-G- Δ I177L an toàn và hiệu quả cao trong các nghiên cứu thử thách sử dụng ASFV-G cường độ gốc. Việc sản xuất quy mô lớn ASFV-G- Δ I177L đã bị hạn chế vì nó chỉ có thể tái tạo hiệu quả trong các đại thực bào sơ cấp của lợn. Tiếp tục nghiên cứu phát triển từ chủng virus ASFV-G- Δ I177L, các nhà khoa học trên đã tạo ra được chủng virus vaccin nhược độc dịch tả lợn châu Phi ASFV-G- Δ I177L/ Δ LVR, thích ứng nhân lên trong một dòng tế bào thường trực có nguồn gốc từ lợn rất ổn định là dòng tế bào thường trực PIPEC (Plum Island Porcine Epithelial Cells). Trong các nghiên cứu thử thách, ASFV-G- Δ I177L/ Δ LVR duy trì cùng mức độ suy giảm độc lực, đặc điểm sinh miễn dịch và hiệu quả bảo vệ như ASFV-G- Δ I177L. ASFV-G- Δ I177L/ Δ LVR là chủng virus vaccin nhược độc ASF đầu tiên được thiết kế hợp lý có thể được sử dụng để sản xuất vaccin thương mại với quy mô lớn.

Được sự giúp đỡ của Bộ NN&PTNT, các cơ quan chức năng mà đứng đầu là Cục Thú y, Tập đoàn DABACO đã được cung cấp chủng virus

vaccin nhược độc ASFV-G-DeltaI177L/Delta LVR, dòng tế bào thường trực PIPEC thích ứng cho chủng ASFV-G-Delta I177L/Delta LVR nhân lên. Chúng tôi tiến hành các nghiên cứu hoàn thiện quy trình nuôi cấy dòng tế bào PIPEC để gây nhiễm chủng virus vaccin nhược độc ASFV-G-Delta I177L/Delta LVR tiến tới nghiên cứu quy trình sản xuất vaccin nhược độc phòng bệnh dịch tả lợn châu Phi cho đàn lợn ở nước ta.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Virus vaccin nhược độc ASF chủng ASFV-G-Delta I177L/Delta LVR do Mỹ cung cấp

- Dòng tế bào thường trực PIPEC do Mỹ cung cấp. Tập đoàn DABACO nhập khẩu theo giấy phép số 999/TY-QLT của Cục Thú y Việt Nam và giấy phép xuất khẩu phía Mỹ cho DABACO số D1242156

- Dòng tế bào thường trực L-929 nhập khẩu từ CLS Cell Lines Service GmbH (Đức) dùng nuôi cấy PBMC để làm HAD₅₀

- Hoá chất và môi trường thường quy cho nuôi cấy virus trên môi trường tế bào: DMEM, RPMI 1640 (Gibco, code 16000-044), FBS, PBS, Trypsin, EDTA, kháng sinh, trepan blue, heparin 5000UI - 25UI/ml máu, dung dịch bảo quản TB trong nitơ lỏng (DMSO), thạch máu và Sabouraud

- Trang thiết bị và dụng cụ thường quy cho nghiên cứu virus và nghiên cứu tế bào: Tủ cấy vô trùng BSL3, tủ ấm thường và tủ ấm CO₂, máy ly tâm, kính hiển vi soi ngược với cùng phần mềm chuyên dụng, tủ lạnh thường và tủ lạnh âm sâu,...

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm BSL3, Trung tâm Chẩn đoán Thú y Tập đoàn DABACO.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nhân và nuôi tế bào PIPEC

- Tế bào được gọi dậy từ dịch bảo quản ở nhiệt độ -196°C bằng cách lấy ống tế bào PIPEC ra khỏi bình nitơ lỏng, làm tan nhanh trong bể ủ cách thủy 37°C trong vòng 2 phút. Khử trùng bằng cồn, chuyển vào tủ cấy vô trùng. Chuyển tế bào sang ống Falcon 50 đã chứa sẵn 10 ml môi trường nuôi PIPEC (đã làm

ấm trước ở 37°C). Ly tâm ở 1.500 vòng/phút trong 5 phút. Nhẹ nhàng hút bỏ dịch nổi.

- Hòa lại cặn tế bào trong 8 ml môi trường PIPEC. Lấy 30 μ l đếm tế bào. Phần còn lại chuyển sang chai T25. Nuôi trong tủ ấm 5% CO₂ ở nhiệt độ 37°C. Quan sát tế bào PIPEC dưới kính hiển vi soi ngược tại các thời điểm 24, 48 và 72 giờ. Khi tế bào đã mọc kín thành thì trypsin hóa làm bong tế bào, nhân nuôi vào chai T25, T75 rồi T225.

- Xác định nồng độ trypsin và EDTA thích hợp để bong tách tế bào: Tác động bong tế bào ở 3 nồng độ trypsin khác nhau, thiết lập quy trình bong tách.

- Thu và bảo quản tế bào giống cấp II ở -196°C theo phương pháp thường quy.

- Gọi dậy tế bào cấp II, nhân nuôi tiếp và theo dõi khả năng sinh trưởng của dòng tế bào.

2.2.2. Gây nhiễm virus vaccin nhược độc chủng ASFV-G-Delta I177L/delta LVR

- Sử dụng chủng giống gốc virus gây nhiễm vào tế bào PIPEC nuôi trên chai T25 theo thường quy ở các liều gây nhiễm khác nhau với MOI = 0,01; 0,02; 0,03.

- Theo dõi biến đổi tế bào nuôi ở các thời điểm sau gây nhiễm 48, 72, 96 và 120 giờ. Thu hoạch virus bằng cách đông băng ở -80°C trong 24 giờ

và giải đông băng đập vỡ tế bào giải phóng virus.

- Xác định hiệu giá virus từ dịch thu ở các liều MOI gây nhiễm khác nhau bằng cách xác định HAD₅₀ trên đĩa 96 giếng nuôi tế bào PBMC có dịch chiết từ môi trường L929. Tính toán theo công thức Reed-Muench.

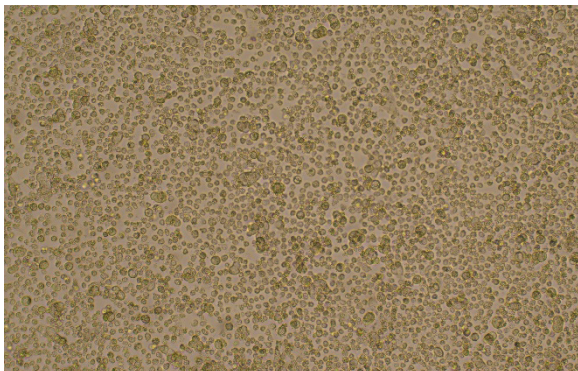
2.2.3. Xác định khả năng nhân lên của virus vaccin nhược độc chủng ASFV-G-Delta I177L/delta LVR bằng realtime-PCR

Dịch virus thu nhận sau khi giải đông băng được xử lý ở nhiệt độ 60°C/30 phút. Vật liệu di truyền của virus được tách chiết bằng kit tách chiết DNA (QIAamp DNA Kit). Realtime-PCR xác định chu kỳ ngưỡng (Ct) của các mẫu nghiên cứu được thực hiện nhờ bộ kit của Applied Biosystem trên máy ABI 7500.

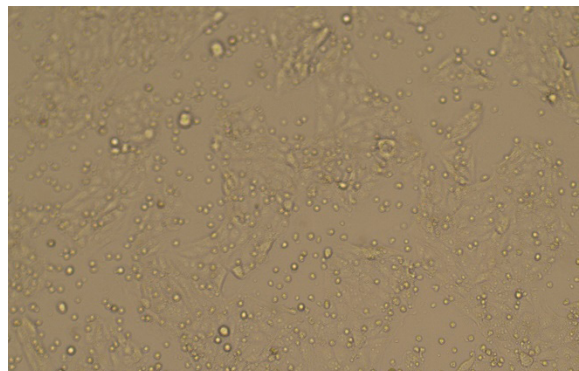
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Nhân và nuôi tế bào PIPEC

Từ một ống tế bào gốc được cung cấp, đã gọi dậy và nuôi cấy vào chai T25 với 8ml dịch nuôi trong điều kiện nhiệt độ 37°C và 5% CO₂. Tuy nhiên trong 5 triệu tế bào gọi dậy sau bảo quản, số tế bào chết xác định được là 2 triệu, số tế bào sống là 3 triệu. Sau 24 giờ, chúng tôi thấy có một số lượng lớn tế bào tiếp tục chết hoặc không bám thành. Một số tế bào đã bám thành chai bắt đầu sinh trưởng và phát triển (hình 1).



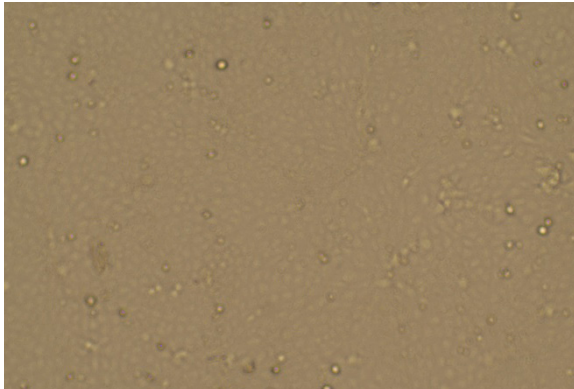
Hình 1. Tế bào PIPEC gọi dậy sau 24 giờ (X100)



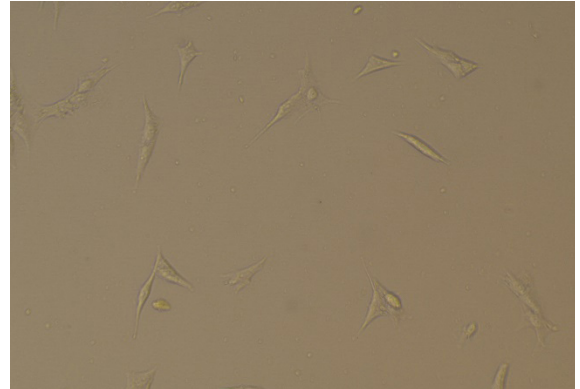
Hình 2. Tế bào PIPEC gọi dậy sau 48 giờ (X100)

Tiến hành thay môi trường và loại bỏ số tế bào không bám thành, xác định được số lượng chết và không bám thành khoảng 2 - 3 triệu. Như vậy, số tế bào sống bám thành sau bảo quản chỉ còn

700.000. Nuôi tiếp đến 72 giờ quan sát thấy tế bào đã mọc lan kín diện tích chai tạo ra tế bào một lớp mịn (hình 3). Tế bào đã phát triển mạnh và bám kín diện tích chai T25.



Hình 3. Tế bào PIPEC bám kín thành chai sau 72 giờ (X100)



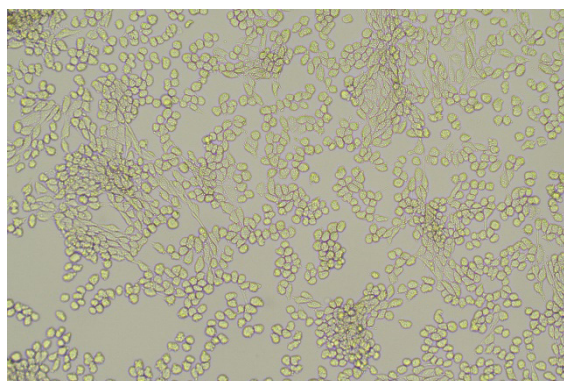
Hình 4. Hình thái của tế bào PIPEC (X100)

Để nhân nuôi dòng tế bào này, chúng tôi đã thăm dò nồng độ trypsin thích hợp để bóc tách tế bào ra khỏi thành chai nuôi. Dùng 3 nồng độ

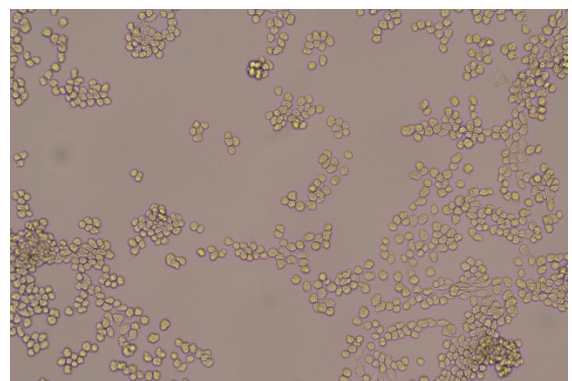
trypsin khác nhau là 0,005; 0,01 và 0,025% tác động vào tế bào nuôi đã bám một lớp kín thành sau 72 giờ nuôi. Kết quả trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả xác định nồng độ trypsin để bong tế bào

Nồng độ trypsin (%)	Thời gian thử nghiệm			
	37°C / 2 phút	37°C / 5 phút	37°C / 10 phút	37°C / 12 phút
0,005	Giãn gian bào	Tế bào co tròn	Tế bào bong lẻ tẻ	Tế bào bong lẻ tẻ
0,010	Giãn rộng gian bào	Tế bào co tròn, một số tế bào bong	Tế bào bong tróc	Tế bào bong tróc hết
0,025	Giãn rộng gian bào	Tế bào co tròn, bong từng mảng	Tế bào bong tróc phần lớn	Tế bào tan rã



Hình 5. Nồng độ trypsin thích hợp tác động sau 3 phút (X100)



Hình 6. Nồng độ trypsin thích hợp tác động sau 5 phút (X100)

Sau khi xác định được liều trypsin thích hợp, chúng tôi đã nuôi cấy và nhân tế bào thành công;

đã xác định được nồng độ cấy vào ban đầu cho 3 loại chai T25, T75 và T225 như bảng 2.

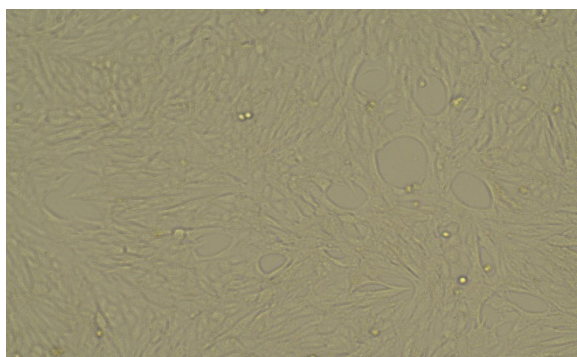
Bảng 2. Số lượng tế bào cấy vào ban đầu và thời gian phủ kín thành ở các chai có diện tích nuôi khác nhau

Chai	Số tế bào ban đầu (triệu)	Lượng tế bào phủ kín sau 48 giờ (%)	Lượng tế bào phủ kín sau 72 giờ
T25	5	60	Kín thành chai
T75	15	60	Kín thành chai
T225	45	60	Kín thành chai

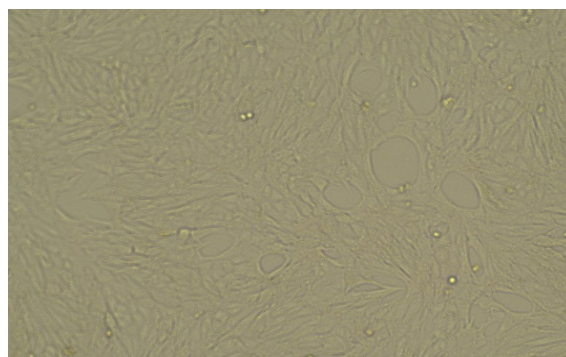
Sau 1 tuần thu hoạch tế bào và đóng ống cryotype với số lượng 5 triệu tế bào /ống (gọi là giống cấp II) rồi thực hiện quy trình bảo quản lưu giữ dòng tế bào theo quy trình kỹ thuật ở -196°C, chúng tôi gọi dậy và nuôi cấy tiếp. Kết quả cho thấy số lượng tế bào

sống và bám thành nhiều hơn so với giống gốc ban đầu (khoảng 4 triệu tế bào).

Tiếp đó chúng tôi nuôi cấy tế bào gọi dậy từ một ống cryotype vào chai T25, sau 72 giờ kết quả được trình bày ở hình 8.



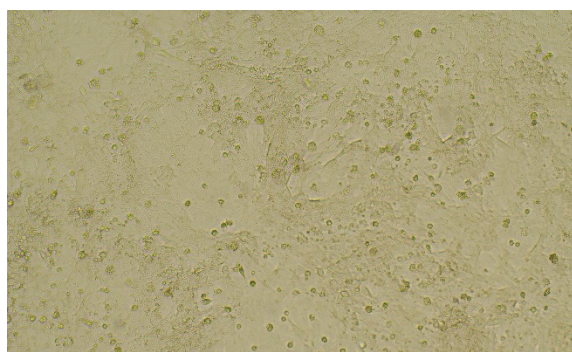
Hình 7. Tế bào PIPEC phủ kín thành sau 72 giờ (X100)



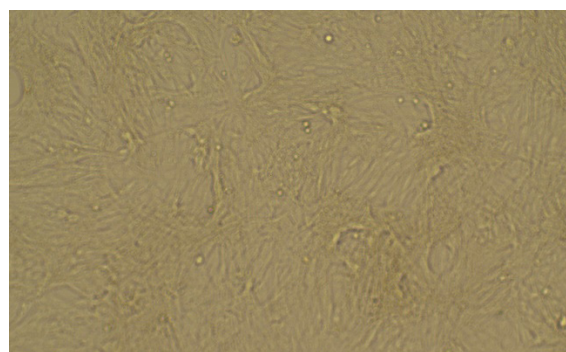
Hình 8. Tế bào PIPEC cấp II sau khi gọi dậy và nuôi 72 giờ

Như vậy với dòng tế bào thường trực PIPEC nhập khẩu, chúng tôi đã nhân nuôi, bảo quản, giữ giống thành công, sẵn sàng cho việc gây nhiễm ASFV.

3.2. Gây nhiễm virus vaccin nhược độc chủng ASFV-G-Delta I177L/delta LVR vào tế bào PIPEC



Hình 9. Tế bào PIPEC gây nhiễm chủng ASFV-G-Delta I177L/delta LVR sau 120 giờ



Hình 10. Tế bào PIPEC đối chứng nuôi 120 giờ

Đã tiến hành gây nhiễm chủng ASFV-G-Delta I177L/delta LVR vào tế bào PIPEC nuôi 72 giờ, với 3 liều gây nhiễm khác nhau: 0,1; 0,2 và 0,3 MOI. Theo dõi sau gây nhiễm 72, 96 và 120 giờ cho thấy: sau 120 giờ quan sát thấy virus gây bệnh tích tế bào. CPE thể hiện tế bào biến dạng, co tròn hoặc thoái hóa, nhân đậm, một số bong tróc khỏi thành chai. Chai tế bào đối chứng nuôi 120 giờ vẫn phát triển bình thường và không có dấu hiệu bong tróc.

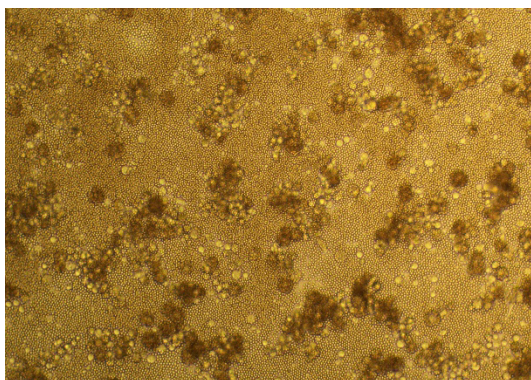
Chúng tôi đã tiến hành chuẩn độ HAD₅₀ trên macrophase từ nuôi PBMC trên 3 chai T25 nuôi tế bào PIPEC đã gây nhiễm chủng ASFV-G-Delta I177L/delta LVR bằng 3 liều gây nhiễm khác nhau. Kết quả được trình bày trên bảng 3. Kết quả chuẩn độ cho thấy, chủng ASFV này bước đầu đã nhân lên khá tốt trên dòng tế bào thường trực PIPEC với HAD₅₀ lần lượt là 10^{4,72}, 10^{5,34} và 10^{5,38}.

Bảng 3. Kết quả chuẩn độ HAD₅₀ của chủng ASFV-G-Delta I177L/delta LVR nuôi trên PIPEC sau 120 giờ

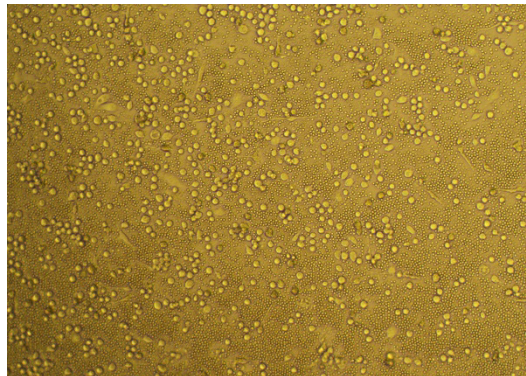
Chai tế bào T25	Liều gây nhiễm (MOI)	Thời gian thu hoạch sau gây nhiễm (giờ)	CPE	HAD ₅₀	Giá trị Ct của realtime-PCR (PC(+)=14,88)
1	0,1	120	+	10 ^{4,67}	14,11
2	0,2	120	+	10 ^{5,49}	13,86
3	0,3	120	+	10 ^{5,96}	11,53

Song song với việc chuẩn độ, chúng tôi tiến hành lấy mẫu dịch virus thu hoạch sau gây nhiễm, thực hiện realtime-PCR xác định chủng

virus và giá trị Ct. Kết quả này cũng chứng tỏ chủng virus nhân lên và duy trì nồng độ khá cao trong dịch nuôi.



Hình 11. HAD (+) sau gây nhiễm chủng ASFV-G-Delta I177L/delta LVR



Hình 12. HAD đối chứng (-)

IV. THẢO LUẬN

Theo Borca và cs. (2021), PIPEC là một dòng tế bào con có nguồn gốc từ dòng tế bào LFPKaba, một dòng tế bào thận của thai lợn. Do có nguồn gốc từ lợn nên dòng tế bào này có thể duy trì khả năng sao chép của ASFV-G-delta I177L/delta LVR trong tế bào biểu mô lợn nhằm xóa bỏ hạn chế chỉ sử dụng

đại thực bào lợn sơ cấp để khuếch đại dòng vacxin ASFV ứng cử viên. ASFV-G-delta I177L/delta LVR duy trì tất cả các đặc điểm mong muốn của ASFV-G-ΔI177L – chủng virus gốc do nhóm nghiên cứu của M.V. Borca tạo ra (Borca và cs., 2020).

Từ dòng tế bào PIPEC nhận được, chúng tôi đã thực nghiệm nuôi cấy ban đầu dòng tế bào này bằng DMEM có 10% HI - FBS ở 37°C và 5% CO₂. Ban

đầu khi gọi dậy từ nitor lỏng, tế bào chết khá nhiều, số còn lại nuôi cấy thì tiếp tục chết và phần lớn không bám thành. Tuy nhiên với số lượng khoảng hơn 10% bám thành phát triển tốt sau 72 giờ đã mọc kín diện tích chai nuôi. Để tiếp tục nhân lên, chúng tôi đã bong tách tế bào và thu được khoảng 5×10^6 tế bào trên diện tích chai T25. Cấy chuyển sang chai T75 với điều kiện nuôi tương tự, tế bào phát triển tốt và cũng mọc kín diện tích chai sau 72 giờ. Dùng số lượng tế bào này nuôi tiếp trong 3 chai T75 đã thu được một lượng tế bào lớn và ổn định.

Trong quá trình bóc tách tế bào từ chai nuôi, chúng tôi cũng đã nghiên cứu xác định được nồng độ trypsin thích hợp sao cho việc bong tách không ảnh hưởng tới sự sống của tế bào nuôi sau này. Khi nuôi được lượng lớn tế bào, đã thu hoạch và tiến hành giữ giống cấp II vào nitor lỏng theo thường quy và gọi dậy thành công. Như vậy sơ bộ nhận định rằng chúng tôi đã thiết kế và nhân nuôi thành công dòng tế bào PIPEC quan trọng này.

Cũng theo M.V. Borca (2021), các vacxin ASF thử nghiệm dựa vào việc sản xuất trong các đại thực bào lợn sơ cấp, rất khó sử dụng để sản xuất vacxin ở cấp độ thương mại. Nhóm nghiên cứu này đã thiết kế thành công một chủng virus vacxin cho ASF mới, bằng cách sử dụng chủng virus xóa gen *I177L* (ASFV-G- Δ I177L) xóa tiếp ở vùng bên trái 9 gen (LVR). Sự loại bỏ này cho phép virus tăng trưởng trong các nền nuôi cấy tế bào PIPEC ổn định trong khi vẫn duy trì hiệu lực và hiệu quả của chủng vacxin ASFV-G- Δ I177L. Khám phá này sẽ cho phép sản xuất vacxin ASF trên quy mô thương mại.

Chủng giống gốc virus nhập khẩu từ Mỹ ASFV-G-delta I177L/delta LVR gây nhiễm trên tế bào PIPEC một lớp với liều gây nhiễm MOI lần lượt là 0,01; 0,02 và 0,03; theo dõi tế bào ở các thời điểm 48, 72, 96 và 120 giờ gây nhiễm. Ở thời điểm 96 giờ, tế bào xuất hiện CPE; đến 120 giờ, CPE thể hiện rõ, có sự khác biệt rõ rệt so với tế bào trong chai đối chứng nuôi 120 giờ không gây nhiễm virus. Xác định chủng virus bằng kỹ thuật realtime-PCR, chuẩn độ HAD_{50} hỗn dịch virus thu được cho thấy virus có mặt và nhân lên tốt trên dòng tế bào thường trực này.

Có thể nhận định rằng: Kết quả nghiên cứu này đã mở ra niềm hy vọng về một vacxin dịch tả lợn châu Phi trong tương lai gần.

V. KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu trên, có kết luận như sau:

- Đã gọi dậy, nuôi cấy, phát triển và bảo quản thành công dòng tế bào thường trực PIPEC sau khi nhập khẩu từ Mỹ.

- Đã gây nhiễm thành công chủng virus nhược độc ASFV-G-Delta I177L/delta LVR nhập khẩu từ Mỹ trên dòng tế bào PIPEC.

Như vậy có thể tiến hành những nghiên cứu tiếp theo nhằm chế tạo được vacxin dịch tả lợn châu Phi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Borca MV, Berggren KA, Ramirez-Medina E, Vuono EA, Gladue DP, 2018. CRISPR/Cas gene editing of a large DNA virus: African swine fever virus. *Bio-protocol* 8:e2978. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2978>.
2. Borca MV, Ramirez-Medina E, Silva E, Vuono E, Rai A, Pruitt S, Holinka LG, Velazquez-Salinas L, Zhu J, Gladue DP, 2020. Development of a highly effective African swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic Eurasia strain. *J Virol* 94:e02017-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02017-19>.
3. Borca, M. V., Rai, A., Ramirez-Medina, E., Silva, E., Velazquez-Salinas, L., Vuono, E., Pruitt, S., Espinoza, N. & Gladue, D. P., 2021. A cell culture-adapted vaccine virus against the current pandemic African swine fever virus strain. *Journal of Virology*, JVI-00123.
4. Gladue DP, Borca MV, 2019. Development of a novel live attenuated African swine fever vaccine based in the deletion of gene I177L. *US Patent* 16580058.
5. 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.1275-1285.2000>.
6. Sanchez-Cordon PJ, Jabbar T, Berrezaie M, Chapman D, Reis A, Sastre P, Rueda P, Goatley L, Dixon LK., 2018. Evaluation of protection induced by immunisation of domestic pigs with deletion mutant African swine fever virus BeninAMGF by different doses and routes. *Vaccine* 36:707-715. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.030>.

Ngày nhận 16-10-2021

Ngày phản biện 28-10-2021

Ngày đăng 1-1-2022