

# Nghiên cứu sản xuất vắc-xin phòng bệnh hoại tử thần kinh cho cá mú nuôi tại Việt Nam

342723

Phạm Thị Tâm<sup>1</sup>, Nguyễn Mạnh Hùng<sup>1</sup>, Phạm Công Hoạt<sup>2</sup>, Trần Thế Mưu<sup>3</sup>, Nguyễn Quang Linh<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Viện Đại học Mở Hà Nội

<sup>2</sup>Bộ Khoa học và Công nghệ

<sup>3</sup>Trung tâm Quốc gia Giống hải sản miền Bắc

<sup>4</sup>Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông lâm Huế

Bài viết đề cập kết quả nghiên cứu sản xuất vắc-xin bất hoạt phòng bệnh hoại tử thần kinh cho cá mú nuôi tại Việt Nam. Giống gốc vắc-xin được tuyển chọn từ 26 chủng NNV phân lập được từ các tỉnh/thành phố Quảng Ninh, Hải Phòng, Nam Định, Khánh Hòa và Bình Thuận, trên cơ sở đánh giá tính tương đồng kháng nguyên và mức độ kích thích sinh đáp ứng miễn dịch bảo hộ đối với bệnh hoại tử thần kinh. Virus được bất hoạt bằng beta-propiolactone 0,01% và phối hợp với hydroxit nhôm để tạo vắc-xin. Bằng phương pháp ngâm, vắc-xin an toàn đối với cá mú từ giai đoạn ấu trùng đến cá bột, tỷ lệ bảo hộ với các liều công cường độ  $0,2 \times \text{TCID}_{50}$ ,  $0,5 \times \text{TCID}_{50}$  và  $1 \times \text{TCID}_{50}$  đạt trên 75%. Đánh giá hiệu lực của vắc-xin trên mô hình thực nghiệm cho thấy tỷ lệ sống của cá ở các ao/lồng thử nghiệm vắc-xin cao hơn so với đối chứng 30-34%, và tỷ lệ tăng trọng của cá thử nghiệm vắc-xin cao hơn các ao/lồng nuôi đối chứng 17-25%.

**Từ khóa:** bảo hộ, cá mú, công cường độ, vắc-xin, virus gây bệnh hoại tử thần kinh.

Chỉ số phân loại 4.6

## DEVELOPING A VACCINE FOR PREVENTION OF NERVOUS NECROSIS DISEASE IN FARMED GROUPER IN VIETNAM

### Summary

The article presents the results of developing a vaccine for prevention of nervous necrosis disease in farmed grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) in Viet Nam. Master seed has been selected based on the degree of inducing sustainable protection immune responses against nervous necrosis disease and the antigenic similarity from 26 NNV isolates that have been isolated from infected grouper in six provinces/cities as Quang Ninh, Hai Phong, Nam Dinh, Khanh Hoa and Binh Thuan. The vaccine has been prepared by inactivated virus due to beta-propiolactone 0,01% and aluminum hydroxide. By the immersion method, the vaccine has been safe to *Epinephelus fuscoguttatus* at larva stage to 1.5 cm in length. The relative protection rate of vaccine has reached above 75% with the challenge dose of  $0,2 \times 10^6,8 \text{ TCID}_{50}$ . The relative percent of survival and the growing rate in experimental models has been higher than control models about 30-34% and 17-25%.

**Keywords:** challenge dose, grouper, nervous necrosis disease, protection, vaccines.

Classification number 4.6

### Bài văn đề

Ứng dụng vắc-xin trên cá là giải pháp giúp phòng chống đặc hiệu các tác nhân gây bệnh hoặc tạo kháng thể bảo hộ, nâng cao khả năng đề kháng với bệnh dịch. Từ năm 1942, Duff đã sử dụng vi khuẩn *Aeromonas salmonicida* bất hoạt trộn vào thức ăn cho cá hồi để phòng bệnh lở loét và xuất huyết [2]. Hiện tại, trên thế giới đã có các vắc-xin thương mại hóa để phòng các bệnh do vi khuẩn *A. salmonicida*, *V. salmonicida*, *V. viscosus*, *V. ordalii*, *V. anguillarum*, *Y. ruckerii*, *R. salmoninarum*, *F. psychrophilum*, *F. columnarum*, *P. salmonis*, *L. garvieae*, *S. iniae*, *P. piscicida*, *E. ictaluri* và các bệnh do virus IPNV, PDV, IHNV, VHSV, ISAV, Iridovirus. Các vắc-xin này đang được sử dụng có hiệu quả ở các nước

có nghề cá phát triển như: Na Uy, Chi Lê, Mỹ, Nhật Bản, Anh, Canada, Hy Lạp, Italia, Pháp, Tây Ban Nha, Ireland [11]. Nhờ sử dụng vắc-xin mà lượng kháng sinh được sử dụng cho cá hồi giảm từ 600 kg/800 nghìn tấn cá năm 2003 xuống còn 300 kg/1.000 tấn cá năm 2008.

Đối với bệnh do virus, vắc-xin phòng bệnh chủ yếu được sản xuất từ kháng nguyên bất hoạt và tái tổ hợp. Vắc-xin bất hoạt được sản xuất từ virus nuôi cấy trên các dòng tế bào liên tục của cá như: BF 2 (tế bào cá mang xanh *Lepomis macrochirus*), SHK1 (tế bào thận trước của cá hồi Atlantic), EPC (tế bào biểu mô cá chép), CHSE 214 (tế bào được tạo ra từ phôi cá hồi vua), FHM (tế bào cá mè trắng), RTG 2 (tế bào tuyến sinh dục của cá hồi vân) [7, 8]. Các loài virus khác nhau sẽ thích nghi với các dòng tế bào miễn dịch khác nhau. Virus được nuôi cấy, thu hồi và gây bất hoạt bởi các loại hóa chất như formalin, binary ethylenimine. Mặc dù vắc-xin này có hiệu quả cao trong việc tạo đáp ứng miễn dịch bảo hộ cho cá, nhưng điều bất lợi trong sản xuất và sử dụng vắc-xin bất hoạt là đòi hỏi lượng lớn kháng nguyên cho mỗi liều tiêm và đưa vắc-xin vào cơ thể theo đường tiêm thì mới đạt được hiệu quả mong muốn [3, 6].

Bệnh hoại tử thần kinh (*Nervous necrosis disease*) do *Nervous Necrosis Virus* - NNV là bệnh cấp tính gây ra trên nhiều loài cá biển, trong đó có cá mú. Bệnh hoại tử thần kinh ở cá mú thường xuất hiện trong giai đoạn cá giống, với tỷ lệ nhiễm lên tới 53/64 mẫu thu thập (tương ứng 82,8%), tỷ lệ cá chết do NNV khoảng 90-100%. Hầu hết các nghiên cứu về NNV đều cho thấy: mô đích của NNV là hệ thần kinh trung ương (gồm não và tủy sống) và võng mạc [5]. Virus này gây hoại tử các neuron thần kinh dẫn đến những biểu hiện bất thường như bơi không định hướng, chủ yếu theo hình tròn ốc hoặc lao thẳng, nhanh về phía trước.

Hiện tại, việc phòng bệnh cho cá được thực hiện theo 2 hướng: loại trừ con giống mang mầm bệnh và sử dụng vắc-xin [2]. Ở Việt Nam, bệnh hoại tử thần kinh gây bệnh cho cá mú, cá chình [12, 13]. Với nỗ lực trong công tác khống chế bệnh hoại tử thần kinh ở Việt Nam, vắc-xin được nghiên cứu sản xuất nhằm góp phần giảm thiểu những thiệt hại do bệnh gây nên, đồng thời tạo cơ sở để phát triển các vắc-xin phòng bệnh khác cho động vật thủy sản.

#### **Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu**

Các chủng virus gây bệnh hoại tử thần kinh được phân lập từ cá mú mắc bệnh tại các tỉnh/thành phố

Quảng Ninh, Hải Phòng, Nam Định, Khánh Hòa, Bình Thuận. Hóa chất, sinh phẩm chẩn đoán sử dụng trong nghiên cứu này đều được mua từ hãng Sigma-Aldrich, Merck, Invitrogen, Pierce, Thermo Science.

#### **Nuôi cấy và chuẩn độ virus**

NNV được nuôi bằng tế bào GS 1 (grouper spleen). Tế bào được hoạt hóa trong môi trường Leibovitz's L-15 (L 15) có 10% huyết thanh bào thai bê (FCS). Điều kiện nuôi tế bào: 27°C, 5% CO<sub>2</sub>, 2 ngày (mật độ 10<sup>6</sup> tế bào/ml). Gây nhiễm NNV vào chai nuôi tế bào GS 1. Chai đối chứng không gây nhiễm NNV. Theo dõi hiệu ứng huỷ hoại tế bào (CPE-cytopathic effect) mỗi ngày. Khi CPE đạt 90-95% thu dịch virus khỏi chai nuôi cấy rồi ly tâm thu dịch nổi có chứa virus.

TCID<sub>50</sub> (Tissue Culture Infective Dose, 50%): chuẩn độ virus được thực hiện trên đĩa nhựa 96 giếng nuôi tế bào GS 1. Dịch virus được pha loãng theo hệ số 10 trong môi trường Hank's. Virus được hấp phụ vào tế bào trong 2 giờ. Tiếp tục nuôi tế bào bằng Leibovitz's L-15 có 10% FCS. Quan sát CPE trong vòng 5 ngày để xác định TCID<sub>50</sub> theo phương pháp của Reed và Muench [9].

#### **Bất hoạt virus**

**Bất hoạt bằng formalin (formaldehyde 35%):** formalin được bổ sung vào dịch virus để đạt nồng độ 0,1 và 0,2%. Hỗn hợp được ủ ở 37°C/24 giờ. Formalin được loại khỏi dịch bất hoạt bằng cách trung hòa với PBS trong 12 giờ.

**Bất hoạt bằng Binary ethylenimine (BEI):** BEI 0,1 M bổ sung vào dịch virus để đạt nồng độ 0,001 và 0,002 M. Hỗn hợp được ủ ở 37°C/36 giờ. BEI được loại khỏi dịch bất hoạt bằng cách trung hòa với 1,0 M Na-thiosulfate trong 12 giờ.

**Bất hoạt bằng beta-propiolactone:** chỉnh pH của dịch virus 7,3, bổ sung beta-propiolactone theo tỷ lệ 1:2000 (v/v). Khuấy hỗn hợp bằng máy khuấy từ trong 24 giờ/4°C. Beta-propiolactone được loại bỏ bằng cách chỉnh pH về 7,0, 37°C/24 giờ.

#### **RT-PCR**

ARN tổng số của NNV được tách bằng kit RNA extraction (Qiagen). Gen đặc hiệu T4 của NNV được xác định bằng bộ kit RT-PCR (Invitrogen) và cặp mồi PCR F1-R3: (5'-GGATTTGGACGTGCGACCAA-3'; 5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'). Phản ứng được thực hiện qua các giai đoạn: RT: 50°C/30 phút; PCR: 30 chu kỳ theo các chu trình nhiệt: 94°C/5 phút, 60°C/45 giây, 72°C/1 phút; 72°C/5 phút.

## Trung hòa tế bào

Phản ứng trung hòa virus NNV được thực hiện trên tế bào GS 1 theo hướng dẫn của Virology methods manual [12].

### Gây miễn dịch trên thỏ

Phương pháp tạo kháng thể đặc hiệu trên thỏ và phản ứng ELISA gián tiếp xác định kháng thể đặc hiệu được thực hiện theo phương pháp của Yoshihito [14].

### Xác định mức độ tương đồng kháng nguyên

Mức độ tương đồng kháng nguyên được đánh giá trên cơ sở thực hiện phản ứng trung hòa giữa các virus phân lập với các mẫu huyết thanh thu được từ thỏ được gây miễn dịch với các mẫu NNV bất hoạt và kháng thể đa dòng kháng NNV (Pierce, Mỹ). Độ tương đồng kháng nguyên 'r1' được tính theo công thức của Rweyemamu và Hingley [10]: nếu giá trị 'r1' nằm trong khoảng 0,3-1,0, thì hai virus có tính tương đồng kháng nguyên; 'r1' < 0,3 thì hai chủng virus không có tính tương đồng kháng nguyên.

### Kết quả và thảo luận

#### Tuyển chọn giống gốc virus

Hiệu quả phòng bệnh của vắc-xin phụ thuộc rất nhiều vào chất lượng giống virus, đặc biệt tính tương đồng của chủng virus vắc-xin với chủng virus gây bệnh. Từ 26 chủng NNV phân lập được trên cá mú mắc bệnh hoại tử thần kinh ở các tỉnh/thành phố Quảng Ninh, Hải Phòng, Nam Định, Khánh Hòa và Bình Thuận được sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ phục vụ mục đích lựa chọn được chủng đại diện kháng nguyên để sản xuất vắc-xin. Bằng phương pháp trung hòa với kháng thể kháng NNV chuẩn của Piece, chúng tôi đã xác định được 8 chủng NNV phân lập bao gồm: QN2, QN4, KH5, HP2, HP4, HP7, KH7 và KH9 được nhận diện đặc hiệu bởi kháng thể này. Đánh giá tính tương đồng kháng nguyên của 8 chủng này với 26 chủng phân lập để lựa chọn chủng vắc-xin thu được kết quả như trong bảng 1.

Bảng 1: hệ số tương đồng kháng nguyên của các chủng virus phân lập

STT	Chủng virus	HP2	HP4	HP7	QN2	QN4	KH5	KH7	KH9
1	QN2	0,3	0,3	1	1	0,5	1	0,3	0,3
2	QN4	0,3	0,3	0,5	1	1	1	0,3	0,3
3	HP2	1	0,3	0,5	0,5	0,5	1	0,1	0,3
4	HP4	0,3	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3
5	HP6	0,3	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,3
6	HP7	0,3	0,3	1	0,5	0,5	1	0,3	0,3
7	HP8	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1	0,5	0,3	0,3
8	HP10	0,3	0,1	0,1	0	0	0,5	0,3	0,3
9	NĐ1	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1	1	0,3	0,3
10	NĐ3	0,5	0,5	0,1	0,3	0,3	1	0,3	0,1
11	NĐ4	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	0,1
12	NĐ5	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	0,1
13	NĐ7	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1	1	0,1	0,1
14	NĐ8	0,1	0,1	0	0,1	0	0,5	0,1	0,1
15	NĐ10	0,1	0,1	0	0	0	0,3	0	0
16	NĐ11	0,1	0,1	0	0	0	0,1	0,1	0
17	KH5	1	1	0,5	1	1	1	1	1
18	KH7	1	1	0,3	0,1	0,1	1	1	1
19	KH9	1	1	0,3	0,1	0,1	1	0,3	1
20	BT2	0,1	0,1	0	0	0	0,5	0,1	0,1
21	BT3	0,1	0,1	0	0	0	0,3	0,1	0
22	BT4	0,1	0,1	0	0	0	0,3	0,1	0
23	BT7	0,1	0,1	0	0	0	0,3	0,1	0
24	BT9	0	0	0	0	0	0,3	0,1	0
25	BT10	0	0	0	0	0	0,3	0,1	0
26	BT12	0	0,1	0	0	0	0,3	0,1	0

Kết quả bảng 1 cho thấy: chủng KH5 có tính tương đồng cao nhất, đạt 25/26 chủng phân lập, chủng này sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo để sản xuất vắc-xin phòng bệnh hoại tử thần kinh cho cá mú nuôi trong nước.

#### Sản xuất vắc-xin phòng bệnh hoại tử thần kinh cho cá mú

##### Xác định điều kiện bất hoạt virus:

Hiện tại, vắc-xin phòng bệnh cho cá được sản xuất chủ yếu ở dạng bất hoạt và được sử dụng ở dạng ngâm. Kỹ thuật này được sử dụng phổ biến cho cá con để tạo ra đáp ứng miễn dịch ngắn, giúp bảo vệ cá ở giai đoạn nhỏ để bị ảnh hưởng bởi các yếu tố stress.

có nghệ cá phát triển như: Na Uy, Chi Lê, Mỹ, Nhật Bản, Anh, Canada, Hy Lạp, Italia, Pháp, Tây Ban Nha, Ireland [11]. Nhờ sử dụng vắc-xin mà lượng kháng sinh được sử dụng cho cá hồi giảm từ 600 kg/800 nghìn tấn cá năm 2003 xuống còn 300 kg/1.000 tấn cá năm 2008.

Đối với bệnh do virus, vắc-xin phòng bệnh chủ yếu được sản xuất từ kháng nguyên bất hoạt và tái tổ hợp. Vắc-xin bất hoạt được sản xuất từ virus nuôi cấy trên các dòng tế bào liên tục của cá như: BF 2 (tế bào cá mang xanh *Lepomis macrochirus*), SHK1 (tế bào thận trước của cá hồi Atlantic), EPC (tế bào biểu mô cá chép), FHSE 214 (tế bào được tạo ra từ phôi cá hồi vua), FHM (tế bào cá mè trắng), RTG 2 (tế bào tuyến sinh dục cá hồi vằn) [7, 8]. Các loài virus khác nhau sẽ thích nghi với các dòng tế bào miễn cảm khác nhau. Virus được nuôi cấy, thu hồi và gây bất hoạt bởi các loại hóa chất như formalin, binary ethylenimine. Mặc dù vắc-xin này có hiệu quả cao trong việc tạo đáp ứng miễn dịch bảo hộ cho cá, nhưng điều bất lợi trong sản xuất và sử dụng vắc-xin bất hoạt là đòi hỏi lượng lớn kháng nguyên cho mỗi liều tiêm và đưa vắc-xin vào cơ thể theo đường tiêm thì mới đạt được hiệu quả mong muốn [3, 6].

Bệnh hoại tử thần kinh (*Nervous necrosis disease*) do *Nervous Necrosis Virus* - NNV là bệnh cấp tính gây ra trên nhiều loài cá biển, trong đó có cá mú. Bệnh hoại tử thần kinh ở cá mú thường xuất hiện trong giai đoạn cá giống, với tỷ lệ nhiễm lên tới 53/64 mẫu thu thập (tương ứng 82,8%), tỷ lệ cá chết do NNV khoảng 90-100%. Hầu hết các nghiên cứu về NNV đều cho thấy: mô đích của NNV là hệ thần kinh trung ương (gồm não và tủy sống) và vồng mạc [5]. Virus này gây hoại tử các neuron thần kinh dẫn đến những biểu hiện bất thường như bơi không định hướng, chủ yếu theo hình tròn ốc hoặc lao thẳng, nhanh về phía trước.

Hiện tại, việc phòng bệnh cho cá được thực hiện theo 2 hướng: loại trừ con giống mang mầm bệnh và sử dụng vắc-xin [2]. Ở Việt Nam, bệnh hoại tử thần kinh gây bệnh cho cá mú, cá chình [12, 13]. Với nỗ lực trong công tác khống chế bệnh hoại tử thần kinh ở Việt Nam, vắc-xin được nghiên cứu sản xuất nhằm góp phần giảm thiểu những thiệt hại do bệnh gây nên, đồng thời tạo cơ sở để phát triển các vắc-xin phòng bệnh khác cho động vật thủy sản.

#### **Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu**

Các chủng virus gây bệnh hoại tử thần kinh được phân lập từ cá mú mắc bệnh tại các tỉnh/thành phố

Quảng Ninh, Hải Phòng, Nam Định, Khánh Hòa, Bình Thuận. Hóa chất, sinh phẩm chẩn đoán sử dụng trong nghiên cứu này đều được mua từ hãng Sigma-Aldrich, Merck, Invitrogen, Pierce, Thermo Science.

#### **Nuôi cấy và chuẩn độ virus**

NNV được nuôi bằng tế bào GS 1 (groupers spleen). Tế bào được hoạt hóa trong môi trường Leibovitz's L-15 (L 15) có 10% huyết thanh bào thai bê (FCS). Điều kiện nuôi tế bào: 27°C, 5% CO<sub>2</sub>, 2 ngày (mật độ 10<sup>5</sup> tế bào/ml). Gây nhiễm NNV vào chai nuôi tế bào GS 1. Chai đôi chứng không gây nhiễm NNV. Theo dõi hiệu ứng huỷ hoại tế bào (CPE-cytopathic effect) mỗi ngày. Khi CPE đạt 90-95% thu dịch virus khỏi chai nuôi cấy rồi ly tâm thu dịch nổi cõ chứa virus.

TCID<sub>50</sub> (Tissue Culture Infective Dose, 50%): chuẩn độ virus được thực hiện trên đĩa nhựa 96 giếng nuôi tế bào GS 1. Dịch virus được pha loãng theo hệ số 10 trong môi trường Hank's. Virus được hấp phụ vào tế bào trong 2 giờ. Tiếp tục nuôi tế bào bằng Leibovitz's L-15 có 10% FCS. Quan sát CPE trong vòng 5 ngày để xác định TCID<sub>50</sub> theo phương pháp của Reed và Muench [9].

#### **Bất hoạt virus**

**Bất hoạt bằng formalin (formaldehyde 35%):** formalin được bổ sung vào dịch virus để đạt nồng độ 0,1 và 0,2%. Hỗn hợp được ủ ở 37°C/24 giờ. Formalin được loại khỏi dịch bất hoạt bằng cách trung hòa với PBS trong 12 giờ.

**Bất hoạt bằng Binary ethylenimine (BEI):** BEI 0,1 M bổ sung vào dịch virus để đạt nồng độ 0,001 và 0,002 M. Hỗn hợp được ủ ở 37°C/36 giờ. BEI được loại khỏi dịch bất hoạt bằng cách trung hòa với 1,0 M Na-thiosulfate trong 12 giờ.

**Bất hoạt bằng beta-propiolactone:** chỉnh pH của dịch virus 7,3, bổ sung beta-propiolactone theo tỷ lệ 1:2000 (v/v). Khuấy hỗn hợp bằng máy khuấy từ trong 24 giờ/4°C. Beta-propiolactone được loại bỏ bằng cách chỉnh pH về 7,0, 37°C/24 giờ.

#### **RT-PCR**

ARN tổng số của NNV được tách bằng kit RNA extraction (Qiagen). Gen đặc hiệu T4 của NNV được xác định bằng bộ kit RT-PCR (Invitrogen) và cặp mồi PCR F1-R3: (5'-GGATTTGGACGTGCGACCAA-3'; 5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'). Phản ứng được thực hiện qua các giai đoạn: RT: 50°C/30 phút; PCR: 30 chu kỳ theo các chu trình nhiệt: 94°C/5 phút, 60°C/45 giây, 72°C/1 phút; 72°C/5 phút.

## Trung hòa tế bào

Phản ứng trung hòa virus NNV được thực hiện trên tế bào GS 1 theo hướng dẫn của Virology methods manual [12].

## Gây miễn dịch trên thỏ

Phương pháp tạo kháng thể đặc hiệu trên thỏ và phản ứng ELISA gián tiếp xác định kháng thể đặc hiệu được thực hiện theo phương pháp của Yoshihito [14].

## Xác định mức độ tương đồng kháng nguyên

Mức độ tương đồng kháng nguyên được đánh giá trên cơ sở thực hiện phản ứng trung hòa giữa các virus phân lập với các mẫu huyết thanh thu được từ thỏ được gây miễn dịch với các mẫu NNV bất hoạt và kháng thể đa dòng kháng NNV (Pierce, Mỹ). Độ tương đồng kháng nguyên 'r1' được tính theo công thức của Rweyemamu và Hingley [10]: nếu giá trị 'r1' nằm trong khoảng 0,3-1,0, thì hai virus có tính tương đồng kháng nguyên; 'r1' < 0,3 thì hai chủng virus không có tính tương đồng kháng nguyên.

## Kết quả và thảo luận

### Tuyển chọn giống gốc virus

Hiệu quả phòng bệnh của vắc-xin phụ thuộc rất nhiều vào chất lượng giống virus, đặc biệt tính tương đồng của chủng virus vắc-xin với chủng virus gây bệnh. Từ 26 chủng NNV phân lập được trên cá mú mắc bệnh hoại tử thần kinh ở các tỉnh/thành phố Quảng Ninh, Hải Phòng, Nam Định, Khánh Hòa và Bình Thuận được sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ phục vụ mục đích lựa chọn được chủng đại diện kháng nguyên để sản xuất vắc-xin. Bằng phương pháp trung hòa với kháng thể kháng NNV chuẩn của Piece, chúng tôi đã xác định được 8 chủng NNV phân lập bao gồm: QN2, QN4, KH5, HP2, HP4, HP7, KH7 và KH9 được nhận diện đặc hiệu bởi kháng thể này. Đánh giá tính tương đồng kháng nguyên của 8 chủng này với 26 chủng phân lập để lựa chọn chủng vắc-xin thu được kết quả như trong bảng 1.

Bảng 1: hệ số tương đồng kháng nguyên của các chủng virus phân lập

STT	Chủng virus	HP2	HP4	HP7	QN2	QN4	KH5	KH7	KH9
1	QN2	0,3	0,3	1	1	0,5	1	0,3	0,3
2	QN4	0,3	0,3	0,5	1	1	1	0,3	0,3
3	HP2	1	0,3	0,5	0,5	0,5	1	0,1	0,3
4	HP4	0,3	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3
5	HP6	0,3	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,3
6	HP7	0,3	0,3	1	0,5	0,5	1	0,3	0,3
7	HP8	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1	0,5	0,3	0,3
8	HP10	0,3	0,1	0,1	0	0	0,5	0,3	0,3
9	ND1	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1	1	0,3	0,3
10	ND3	0,5	0,5	0,1	0,3	0,3	1	0,3	0,1
11	ND4	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	0,1
12	ND5	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	0,1
13	ND7	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1	1	0,1	0,1
14	ND8	0,1	0,1	0	0,1	0	0,5	0,1	0,1
15	ND10	0,1	0,1	0	0	0	0,3	0	0
16	ND11	0,1	0,1	0	0	0	0,1	0,1	0
17	KH5	1	1	0,5	1	1	1	1	1
18	KH7	1	1	0,3	0,1	0,1	1	1	1
19	KH9	1	1	0,3	0,1	0,1	1	0,3	1
20	BT2	0,1	0,1	0	0	0	0,5	0,1	0,1
21	BT3	0,1	0,1	0	0	0	0,3	0,1	0
22	BT4	0,1	0,1	0	0	0	0,3	0,1	0
23	BT7	0,1	0,1	0	0	0	0,3	0,1	0
24	BT9	0	0	0	0	0	0,3	0,1	0
25	BT10	0	0	0	0	0	0,3	0,1	0
26	BT12	0	0,1	0	0	0	0,3	0,1	0

Kết quả bảng 1 cho thấy: chủng KH5 có tính tương đồng cao nhất, đạt 25/26 chủng phân lập, chủng này sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo để sản xuất vắc-xin phòng bệnh hoại tử thần kinh cho cá mú nuôi trong nước.

### Sản xuất vắc-xin phòng bệnh hoại tử thần kinh cho cá mú

#### Xác định điều kiện bất hoạt virus:

Hiện tại, vắc-xin phòng bệnh cho cá được sản xuất chủ yếu ở dạng bất hoạt và được sử dụng ở dạng ngâm. Kỹ thuật này được sử dụng phổ biến cho cá con để tạo ra đáp ứng miễn dịch ngắn, giúp bảo vệ cá ở giai đoạn nhỏ để bị ảnh hưởng bởi các yếu tố stress.

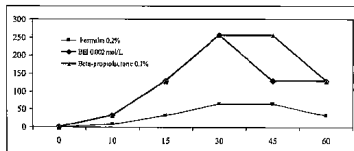
Chủng NNV KH05 được nuôi cấy trong tế bào GS 1 rồi chuẩn độ để đạt liều  $TCID_{50} = 10^{6,2}$ . Virus được xử lý bất hoạt với ba loại hóa chất là formaldehyde, beta-propiolactone và BEI với các nồng độ tương ứng là: 0,1 và 0,2%; 0,05 và 0,1%; 0,001 và 0,002 M rồi gây nhiễm trở lại trên đĩa tế bào GS 1 để đánh giá mức độ bất hoạt thông qua sự hình thành bệnh tích tế bào (CPE) và qua thể vùi trong tế bào bằng phản ứng PCR phát hiện gen mã hóa protein vỏ của NNV.

Bảng 2: kết quả đánh giá mức độ bất hoạt của NNV

Các chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ formalin		Nồng độ BEI		Nồng độ beta-propiolactone	
	0,1%	0,2%	0,001 mol/l	0,002 mol/l	0,05%	0,1%
Mức độ gây hoại tử bào (CPE %)	80	0	10	0	30	0
Gen T2	+	-	+	-	+	-

Kết quả đánh giá mức độ bất hoạt ở bảng 2 cho thấy, các hóa chất formaldehyde, beta-propiolactone và BEI đều có khả năng gây bất hoạt virus NNV với các nồng độ gây bất hoạt tương ứng là 0,2%, 0,1% và 0,002 mol/l. Vấn đề đặt ra là, mặc dù cả ba loại hóa chất nêu trên đều có khả năng gây bất hoạt NNV nhưng chúng có ảnh hưởng đến khả năng tạo đáp ứng miễn dịch đặc hiệu trên cá hay không?

Để trả lời câu hỏi này, thí nghiệm được thực hiện với bốn nghiệm thức, trong đó: một nghiệm thức đối chứng, ba nghiệm thức còn lại cá được gây miễn dịch với NNV bất hoạt với formaldehyde, beta-propiolactone, BEI, và xác định kháng thể trung hòa tạo thành. Kết quả trình bày ở hình 1 cho thấy, hiệu giá kháng thể trung hòa được tạo ra từ virus bất hoạt với BEI và beta-propiolactone cao hơn so với virus bất hoạt với formalin từ 4-8 lần. Qua kết quả trong hình 1 và bảng 2 có thể thấy formaldehyde có khả năng bất hoạt virus nhưng làm giảm mức độ tạo đáp ứng miễn dịch ở cá. Trong khi đó BEI và beta-propiolactone với nồng độ tương ứng là 0,002 mol/l và 0,1% có thể gây bất hoạt hoàn toàn NNV nhưng vẫn đảm bảo tính kháng nguyên của virus.



Hình 1. Đáp ứng miễn dịch của NNV bất hoạt

### Chọn lọc chất bổ trợ vắc-xin:

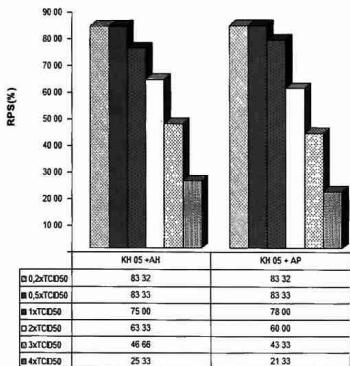
Để sản xuất được vắc-xin phòng bệnh hoại tử thần kinh có hiệu quả, ngoài giống virus thì việc nghiên cứu xác định chất bổ trợ ổn định, phù hợp với phương thức sử dụng cũng như đặc điểm sinh lý của cá từ giai đoạn ấu trùng đến cá bột cũng là một yếu tố quyết định đến chất lượng của sản phẩm và đáp ứng được yêu cầu sản xuất ứng dụng. Đối với cá hồi, vắc-xin nhũ dầu mặc dù có hiệu quả cao đối với bệnh *Furunculosis* nhưng lại gây tổn thương ở xoang phúc mạc của cá. Nghiên cứu lựa chọn chất bổ trợ là yếu tố quan trọng trong quy trình sản xuất để đảm bảo tính an toàn của vắc-xin [4]. Trên cơ sở các nghiên cứu của thế giới về vắc-xin phòng bệnh cho cá, chúng tôi xác định chất bổ trợ vắc-xin cho cá mần các điều kiện: an toàn với cá từ giai đoạn ấu trùng đến cá bột, có hiệu lực phòng bệnh, nguyên liệu sẵn có trên thị trường và giá thành thấp.

Trong nghiên cứu này, chủng vắc-xin KH05 được sử dụng ở hai dạng để gây đáp ứng miễn dịch, gồm: virus bất hoạt và virus bất hoạt phối hợp với các chất bổ trợ là aluminum hydroxide (AH) và aluminum phosphate (AP). Các lô cá được ngâm với dung dịch virus hai lần, cách nhau 10 ngày, tiếp tục theo dõi cá thí nghiệm trong 30 ngày để đánh giá độ an toàn của vắc-xin.

Thí nghiệm xác định chất bổ trợ của vắc-xin được thực hiện đồng thời 2 tiêu chí: (i) khả năng tạo kháng thể trung hòa và (ii) độ an toàn. Thí nghiệm đánh giá khả năng bảo hộ của vắc-xin được bố trí thành 4 lô, mỗi lô 100 cá mú bột (1,5 cm) được gây miễn dịch với vắc-xin bất hoạt bổ sung AH, AP. Ở ngày thứ 30 sau khi gây miễn dịch, cá được chia thành 6 nhóm, mỗi nhóm 10 cá rồi công cường độc riêng rẽ với chủng NNV ( $TCID_{50} = 10^{6,8}$ ) với các liều: 0,2xTCID<sub>50</sub>, 0,5xTCID<sub>50</sub>, 1xTCID<sub>50</sub>, 2xTCID<sub>50</sub>, 3xTCID<sub>50</sub>, 4xTCID<sub>50</sub>. Ở lô đối chứng, cá không được gây miễn dịch với bất kỳ loại kháng nguyên nào nhưng vẫn công cường độc với liều như trên ở ngày thứ 30. Tiếp tục theo dõi cá trong 15 ngày để đánh giá mức độ bảo hộ. Tỷ lệ bảo hộ được tính bằng công thức: tỷ lệ chết ở lô thí nghiệm - tỷ lệ chết ở lô đối chứng âm/tỷ lệ chết ở lô đối chứng dương.

Kết quả thể hiện trong hình 2 cho thấy, tỷ lệ bảo hộ tương đối của cá được gây miễn dịch với các kháng nguyên có bổ sung nhôm hydroxit và nhôm phosphate cho khả năng bảo hộ cao với các liều 0,2xTCID<sub>50</sub>, 0,5xTCID<sub>50</sub> và 1xTCID<sub>50</sub>, với tỷ lệ bảo hộ trên 75%. Với các lô cá được công lý cho tỷ lệ bảo hộ thấp hơn, với các liều công cường độc từ

0,5xTCID<sub>50</sub> - 4xTCID<sub>50</sub>, tỷ lệ bảo hộ tương đối thấp hơn so với hai lô kháng nguyên bổ sung AH và AP khoảng 4-8%. Kết quả thí nghiệm cho phép lựa chọn hydroxit nhôm làm chất bổ trợ chế tạo vắc-xin keo phèn phòng bệnh hoại tử thần kinh cho cá mú.



Hình 2: mức độ bảo hộ của vắc-xin bất hoạt với các chất bổ trợ khác nhau

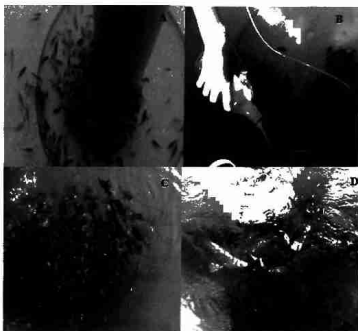
### Đánh giá hiệu lực của vắc-xin ở mô hình nuôi cá thương phẩm

Hiệu lực của một vắc-xin phòng bệnh cho cá không chỉ phụ thuộc vào chất lượng của kháng nguyên mà còn bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác như căn nguyên bệnh, tuổi cá, đường đưa vắc-xin, nhiệt độ môi trường nước trong quá trình sử dụng vắc-xin, kỹ thuật sử dụng. Sử dụng vắc-xin để phòng hiệu quả một bệnh nào đó đòi hỏi phải có các nghiên cứu tổng hợp để đưa ra được giải pháp tốt nhất, hạn chế tối đa ảnh hưởng của bệnh đến hiệu quả kinh tế của nghề nuôi cá.

Vắc-xin bất hoạt keo phèn phòng bệnh hoại tử thần kinh được chuẩn bị theo mô tả ở trên và ứng dụng trong sản xuất cá mú giống tại Trung tâm Giống hải sản Cát Bà (Hải Phòng). Vắc-xin được sử dụng bằng phương pháp ngâm cho cá từ giai đoạn ấu trùng nuôi trong bể ương đến giai đoạn cá giống chuyển ra bè nuôi trên biển. Vắc-xin được chủng ba lần, các chỉ tiêu theo dõi bao gồm: tỷ lệ sống và ảnh hưởng của vắc-xin đến tốc độ tăng trưởng của cá. Kết quả theo dõi cá ở bảng 3.

Bảng 3: đánh giá hiệu lực của vắc-xin phòng bệnh hoại tử thần kinh ở mô hình nuôi cá mú thực nghiệm (RPS: Relative Percent Survival - tỷ lệ sống)

Loại hình nuôi	Vắc-xin		Đối chứng không sử dụng vắc-xin	
	RPS (%)	Tỷ lệ tăng trọng bình quân/tháng (%)	RPS (%)	Tỷ lệ tăng trọng bình quân/tháng (%)
Mô hình nuôi lồng trên biển	00	125	35	100
Mô hình nuôi trong ao đất	72	117	38	100



Hình 3: hình ảnh lô cá thử nghiệm vắc-xin (A: ấu trùng, B: cá bột, C: cá giống, D: cá sau khi chủng vắc-xin được nuôi lồng trên biển)

Vắc-xin được chủng cho cá ba lần trong bể ương, nhiệt độ nước 24-28°C. Kết quả ở bảng 3 cho thấy tỷ lệ sống của cá ở các mô hình thử nghiệm vắc-xin cao hơn so với các ao/lồng nuôi đối chứng từ 30-34%, đồng thời tỷ lệ tăng trọng của cá ở các mô hình thử nghiệm vắc-xin cao hơn các ao/lồng nuôi đối chứng từ 17-25%.

### Kết luận

Đánh giá bước đầu cho thấy, bằng phương pháp ngâm vắc-xin phòng bệnh hoại tử thần kinh từ chủng virus KH05 có hiệu quả tốt trong ngăn ngừa dịch bệnh. Tuy nhiên, để đánh giá chính xác hơn hiệu quả phòng bệnh, vắc-xin cần được theo dõi thêm một mùa dịch tới vào tháng 4.2015. Bên cạnh đó, cần thiết có các nghiên cứu tiếp theo về các đối tượng, lứa tuổi sử dụng vắc-xin để nâng cao hiệu quả phòng bệnh cũng như hiệu lực của vắc-xin với nhiều loài cá mú khác nhau.

## Tài liệu tham khảo

- [1] Brian W.J Mahy and Hillar O Kangro (1996), "Virology Methods Manual", *Academic Press*, London.
- [2] Duff D.C.B (1942), "The oral immunization of trout against, *Bacterium salmonicida*", *J. Immunol*, **44**, 87-94.
- [3] Evelyn T.P.T (1997), "A historical review of fish vaccinology. In vaccinology developments in biological standardization", *Karger, Basel, Switzerland*, **90**, 3-12.
- [4] Evensen Ø, Brudaseth B and Mutoloki S (2005), "The vaccine formulation and its role in inflammatory processes in fish - Effects and adverse effects", *Dev Biol. Stand.*, **121**, 117-125.
- [5] Hedge C.L, Chen Q.W, Qin T.J, Lam Y.M. Sin (2002), "Characterization, pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus tauvina*, in Singapore", *Aquaculture*, **213**, 65-72.
- [6] Lorenzen N, Lapatra S E (1999), *Fish & Shellfish Immunology*, **9**(4), 345-360
- [7] OIE. Aquatic Animal Health Code (10<sup>th</sup> edition) (2007), *World Organisation for Animal Health*, Paris, 238.
- [8] OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (5<sup>th</sup> edition) (2006), *World Organisation for Animal Health*, Paris, 469.
- [9] Reed L.J, Muench H (1938), "A simple method of estimating fifty percent endpoints", *The American Journal of Hygiene*, **27**, 493-497.
- [10] Rweyemamu M.M and Hingley P.J (1984), "Foot-and-mouth disease virus strain differentiation: analysis of the serological data", *Biol Stand*, **12**, 225-229.
- [11] Sommerset I, Krossøy B, Biering E, Frost P (2005), "Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev Vaccines*", **4**(1), 89-101.
- [12] Phạm Thị Tâm, Nguyễn Thị Thu Hiền, Bùi Thị Hải Hòa, Phạm Công Hoat, Nguyễn Quang Linh (2013), "Nghiên cứu lựa chọn chủng virus phục vụ sản xuất vắc-xin phòng bệnh hoại tử thần kinh cho cá mú nuôi tại Việt Nam", *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, 459-464.
- [13] Phạm Thị Tâm, Phạm Công Hoat, Nguyễn Thị Vui, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Quang Linh (2012), "Xác định virus gây bệnh hoại tử thần kinh (*Nervous Necrosis Virus*) trên cá chính nuôi tại vùng biển miền Trung", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, **12**, 65-69.
- [14] Yoshihito Kihwaraki (2002), "Immunological Laboratory techniques", *Japan International Cooperation Agency*.