

# ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG TẠO ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA KHÁNG NGUYÊN VIRUS GÂY BỆNH HOẠI TỬ THẦN KINH (NNV)

Nguyễn Thị Thanh<sup>1</sup>, Phạm Thị Tâm<sup>2</sup>, Phạm Công Hoại,  
Lê Văn Năm<sup>3</sup>, Trần Thế Mưu<sup>3</sup>, Nguyễn Quang Linh<sup>4</sup>

## TÓM TẮT

Đánh giá khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên virus gây bệnh hoại tử thần kinh (NNV) bất hoạt, *E. coli* BL21/NNV và kháng nguyên tái tổ hợp T4 trên thỏ và cá mú con cho thấy:

Trong huyết thanh thỏ, đánh giá bằng hệ thống *in vitro*, kháng thể trung hòa đạt cao nhất ở ngày thứ 35-45 sau khi gây miễn dịch. Mức độ gây đáp ứng của NNV bất hoạt và *E. coli* BL21/NNV là tương đương nhau, kháng thể trung hòa có độ pha loãng huyết thanh đạt 1:800-1:1600 ở ngày thứ 35-45, đến ngày thứ 60 còn 1:400; Ở lô thỏ tiêm protein tái tổ hợp T4, mức độ đáp ứng miễn dịch kém hơn, kháng thể trung hòa đạt được với độ pha loãng huyết thanh là 1:200 và 1:100 ở các ngày tương ứng. Bằng hệ thống *in vivo*, độ pha loãng huyết thanh có kháng thể trung hòa ở ngày thứ 60 là 1:100, 1:50, 1:10, tương ứng với các lô gây miễn dịch bởi NNV bất hoạt, *E. coli* BL21/NNV và protein tái tổ hợp T4.

Đối với cá mú con, kháng thể trung hòa vẫn được phát hiện ở ngày thứ 90 với cả ba lô thí nghiệm (mặc dù gen mã hóa kháng nguyên của NNV được phát hiện thấy trong lô cá thí nghiệm với *E. coli* BL21/NNV và protein tái tổ hợp T4), mức độ tạo đáp ứng miễn dịch mạnh nhất là ở ngày thứ 30-45. Trong đó, đáp ứng miễn dịch đặc hiệu ở cá được tiêm NNV bất hoạt cao hơn kháng nguyên tái tổ hợp T4 và tương đương với vi khuẩn biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên *E. coli* BL21/NNV. Sự hình thành kháng thể trung hòa NNV ở cá mú con cho đến ngày thứ 90 là cơ sở để sản xuất vacxin phòng bệnh.

*Từ khóa:* Kháng thể trung hòa, Đáp ứng miễn dịch, Virus gây hoại tử thần kinh (NNV), Kháng nguyên tái tổ hợp

## Evaluation of ability on inducing immune response of nervous necrosis virus antigen

Nguyễn Thị Thanh, Phạm Thị Tâm, Phạm Công Hoại,  
Lê Văn Năm, Trần Thế Mưu, Nguyễn Quang Linh

## SUMMARY

Ability of inducing immune response of the inactivated Nervous Necrosis Virus (NNV), *E. coli* BL21/NNV expression of T4 gene, encoding NNV antigen and T4 gene recombinant protein, encoding NNV antigen in rabbit and grouper fry was evaluated.

The studied result indicated that: In rabbit serum, by using an *in vitro* assay system, neutralized antibody reached the highest level at the days: 35th - 45th after immunization.

<sup>1</sup> Khoa Nông Lâm Ngư, Trường Đại học Vĩnh

<sup>2</sup> Khoa Công nghệ sinh học, Viện đại học Mỏ Hà Nội

<sup>3</sup> Bộ Khoa học và Công nghệ

<sup>4</sup> Hội đồng Chức danh Giáo sư Nhà nước

<sup>5</sup> Trung tâm Giống hải sản miền Bắc, Viện NTTS I

<sup>6</sup> Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông lâm Huế

The level of inducing immune response of the inactivated NNV and *E. coli* BL21/NNV was equal, neutralized antibody diluting serum reached 1:800-1:1600 at the days: 35<sup>th</sup> - 45<sup>th</sup>. Until the day 60<sup>th</sup>, this concentration reduced to 1:400. In the rabbit group vaccinated with T4 recombinant protein, level of immune response was lower, neutralized antibody with diluting serum concentration reached 1:200 and 1:100 at the days: 35<sup>th</sup> - 45<sup>th</sup>. By using an *in vivo* assay system, the diluting serum concentrations having neutralized antibody in the day 60<sup>th</sup> were 1:100, 1:50, 1:10, respectively to the vaccinated groups with the inactivated NNV, *E. coli* BL21/NNV and T4 gene recombinant protein.

For grouper fry, neutralized antibody was still found at the day 90<sup>th</sup> with 3 experimental groups (although gene encoding antigen of NNV was identified in the experimental fish group with *E. coli* BL21/NNV and T4 gene recombinant protein). The highest level of creating immune response was at the days: 30<sup>th</sup>- 45<sup>th</sup>. Of which, the specific immune response in fish vaccinated with inactivated NNV was higher than that of T4 gene recombinant antigen and similar with *E. coli* BL21/NNV, expression of T4 gene, encoding NNV antigen. The creation of NNV neutralized antigen in grouper fry until the day 90<sup>th</sup> was a basis for producing vaccine against NNV disease in marine fish culture.

**Key words:** Neutralized antibody, Immune response, Nervous Necrosis Virus (NNV), Recombinant antigen.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nervous Necrosis Virus (NNV) có khả năng gây bệnh trên ấu trùng, juvenile của nhiều loài cá biển [9]. Ở Việt Nam, bệnh hoại tử thần kinh đã được phát hiện trên cá mú và cá chình [1, 2]. Trên cá mú, bệnh gây thiệt hại chủ yếu cho cá ở giai đoạn ấu trùng và cá bột, tỷ lệ thất thoát có thể lên tới 90%. Xây dựng các giải pháp giám sát và khống chế bệnh cần triển khai đồng bộ các nghiên cứu về dịch tễ, chẩn đoán và đặc điểm miễn dịch học [4, 11, 13]. Để ngăn ngừa khả năng nhiễm bệnh vào ấu trùng mẫn cảm, cá được xử lý bằng ozone, iodine ở hàm lượng thấp, các dụng cụ ấp nở được xử lý bằng sodium hypochlorite, benzalkonium chloride hoặc iodine [3]. Tuy nhiên, các phương thức sát trùng này không đảm bảo loại trừ virus ở các giai đoạn sản xuất giống vì vậy cá bột có thể bị nhiễm NNV ở giai đoạn nuôi thương phẩm. Vì vậy, phòng bệnh bằng vaccine là giải pháp giúp kiểm soát có hiệu quả bệnh do virus này [11].

Trong vài năm gần đây, vaccine protein tái tổ hợp được nghiên cứu và ứng dụng để ngăn ngừa các bệnh như hoại tử tuyến tụy do Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) [5], xuất huyết do Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) [8], hoại tử cơ quan tạo máu

do Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) [7], hoại tử thần kinh do Nervous Necrosis Virus [6, 12]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch của cá mú với kháng nguyên của NNV để làm cơ sở sản xuất vaccine tái tổ hợp phòng bệnh hoại tử thần kinh trên cá mú.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Chủng virus gây bệnh hoại tử thần kinh (NNV) ký hiệu KH05 bất hoạt bằng formalin.
- Chủng vi khuẩn *E.coli* BL21/NNV biểu hiện gen T4 mã hóa kháng nguyên vỏ của NNV.
- Protein tái tổ hợp gen T4 mã hóa kháng nguyên vỏ của NNV.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Phương pháp bất hoạt virus

NNV được bất hoạt bởi formalin 0,3% ở 37°C trong 12h. Sau 12h trung hòa formalin bằng dung dịch  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  35%, thực hiện lắng dịch liên tục trong 24 giờ.

### 2.2.2 Phương pháp tạo sinh khối vi khuẩn *E.coli* BL21/NNV

Chủng vi khuẩn *E.coli* BL21/NNV mang gen T4 mã hóa kháng nguyên vỏ của NNV được hoạt hóa trong 10ml môi trường LB ở 37°C rồi tiếp tục tăng sinh trong 1 l môi trường LB có chứa ampicillin (100 mg/ml) ở 37°C cho đến khi đạt mật độ có giá trị  $OD_{600} = 0,6$ . Bổ sung IPTG 1 mM vào canh khuẩn rồi tiếp tục nuôi 6h ở 37°C. Vi khuẩn được ly tâm và giữ trong PBS để gây đáp ứng miễn dịch cho động vật thí nghiệm.

### 2.2.3 Phương pháp tách, tinh sạch protein tái tổ hợp

Protein tái tổ hợp được tạo ra từ quá trình biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên vỏ T4 của NNV trong tế bào *E.coli* BL21 được tách chiết và tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni-NTA (Qiagen, Mỹ). *E.coli* BL21/NNV được tăng sinh trong môi trường LB ở 37°C trong 6 tiếng rồi xử lý bằng phương pháp siêu âm siêu tốc trong dung dịch phá vỡ tế bào (8 M Urea, 100 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM Tris- HCl, pH 8) rồi ly tâm 10 phút, tốc độ 14.000 vòng/phút. Dịch nổi được bổ sung vào cột sắc ký 50 % Ni-NTA với dung dịch đệm (8 M Urea, 100 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM Tris- HCl, pH 6.3). Protein tái tổ hợp được tách bằng các dung dịch thẩm (8 M Urea, 100 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM Tris- HCl, pH 5.9) và 8 M urea, 100 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM Tris- HCl, pH 4.5). Protein tái tổ hợp được đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE 12%.

### 2.2.4 Phương pháp gây miễn dịch trên cá mú

Phương pháp tiêm: cá mú bột kích thước 1-1,5cm được cung cấp bởi Trung tâm Giống Hải sản miền Bắc, Viện NTTS 1 được nuôi 3 tuần ở 23-25°C để ổn định sinh lý rồi chia thành 4 lô: i) lô 1: gây miễn dịch với NNV bất hoạt, ii) lô 2: gây miễn dịch với *E.coli* BL21/NNV, iii) lô 3: gây miễn dịch với protein tái tổ hợp T4, lô 4: đối chứng âm.

Các lô gây miễn dịch được tiêm nhắc lại vào các ngày thứ 15.

### 2.2.5 Phương pháp trung hòa in vitro

\* Phản ứng trung hòa bằng kháng thể đặc hiệu: Huyết thanh thô được gây miễn dịch với NNV, *E.coli* BL21/NNV và protein tái tổ hợp T4 được pha loãng theo hệ số 10 rồi thực hiện phản ứng trung hòa với chủng NNV cường độc ký hiệu QN 02 với liều  $10^4$ TCID<sub>50</sub>. Phản ứng trung hòa virus được thực hiện ở 4°C qua đêm. Nuôi cấy dịch trung hòa vào đĩa tế bào GS01 với môi trường Leibovit's L15, mỗi giếng bổ sung 20μl hỗn dịch antisera-virus. Giếng đối chứng dương nuôi cấy NNV QN 02 hiệu giá  $10^4$ TCID<sub>50</sub>. Giếng đối chứng âm bổ sung 20μl huyết thanh đặc hiệu với NNV, *E.coli* BL21/NNV và protein tái tổ hợp T4 được pha loãng theo tỷ lệ 1:10. Hiệu ứng hủy hoại tế bào (CPE) được đánh giá trong 7 ngày thí nghiệm.

\* Phản ứng trung hòa bằng cá mú con được gây miễn dịch: cá mú bột được gây miễn dịch với NNV bất hoạt, *E.coli* BL21/NNV và protein tái tổ hợp T4. Nghiền các mẫu cá này bằng máy đồng nhỏ trong dung dịch muối cân bằng Hanks (HBSS) với tỷ lệ 1:10. Sau đó đem ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 15 phút, ở 4°C. Dịch nổi được bú ra và lọc qua màng lọc 0,45μm. Dịch lọc ủ với chủng NNV cường độc ký hiệu QN 02 với liều  $10^4$ TCID<sub>50</sub>. Phản ứng trung hòa virus được thực hiện ở 4°C qua đêm. Nuôi cấy dịch trung hòa vào đĩa tế bào GS01 với môi trường Leibovit's L15, mỗi giếng bổ sung 20μl hỗn dịch dịch lọc-virus. Giếng đối chứng âm nuôi cấy NNV QN 02 hiệu giá  $10^4$ TCID<sub>50</sub>. Giếng đối chứng âm bổ sung 20μl dịch lọc từ mẫu cá được gây miễn dịch với NNV, *E.coli* BL21/NNV và protein tái tổ hợp T4 được pha loãng theo tỷ lệ 1:10. Hiệu ứng hủy hoại tế bào (CPE) được đánh giá trong 7 ngày thí nghiệm.

### 2.2.7 Phản ứng trung hòa in vivo

Cá mú bột được gây miễn dịch với NNV bất hoạt, *E.coli* BL21/NNV và protein tái tổ hợp T4. Lô đối chứng dương không gây miễn dịch, chỉ gây nhiễm với NNV QN 02. Lô đối chứng âm không công cường độc với NNV QN 02. Theo dõi, đánh giá tỷ lệ chết/ nhiễm của các lô cá thí nghiệm trong 45 ngày.

### III. KẾT QUẢ

#### 3.1. Đánh giá khả năng tạo kháng thể trung hòa của kháng nguyên tái tổ hợp

Việc tạo thành kháng thể trung hòa là tiêu chí quan trọng để đánh giá một kháng nguyên nào đó có thể sử dụng để sản xuất vaccin được hay không. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng kích thích tạo kháng thể trung hòa trên thỏ của NNV bất hoạt, *E.coli* BL21/NNV biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên vỏ của NNV và protein tái tổ hợp gen mã hóa kháng nguyên vỏ T4 của NNV. Huyết thanh thỏ sau khi gây miễn dịch được sử dụng để thực hiện các phản ứng trung hòa *in vitro* và *in vivo*. Thí nghiệm được bố trí như sau:

+ Đối chứng dương: huyết thanh thỏ khỏe,

không có kháng thể đặc hiệu với NNV được ủ với chủng NNV cường độc QN02 rồi hấp phụ vào tế bào GS01 hoặc gây nhiễm vào cá mú nhỏ (5g) bằng phương pháp tiêm.

+ Đối chứng âm: huyết thanh thỏ được gây miễn dịch với NNV, *E.coli* BL21/NNV và protein tái tổ hợp T4 pha loãng theo hệ số 10 rồi hấp phụ vào tế bào GS01 hoặc gây nhiễm vào cá mú nhỏ (5g) bằng phương pháp tiêm.

+ Lô thí nghiệm: huyết thanh thỏ được gây miễn dịch với NNV, *E.coli* BL21/NNV và protein tái tổ hợp T4 pha loãng theo hệ số 10 được ủ với chủng NNV cường độc QN02 liều  $10^4$ TCID<sub>50</sub> rồi hấp phụ vào tế bào GS01 hoặc gây nhiễm vào cá mú nhỏ (5g) bằng phương pháp tiêm.

Kết quả trình bày trong bảng 1 và 2.

**Bảng 1: Kết quả xác định hiệu giá kháng thể trung hòa virus gây bệnh hoại tử thần kinh ở hệ thống *in vitro***

Thời gian thu huyết thanh thỏ sau khi gây miễn dịch (ngày)	Đối chứng dương (CPE %)	Đối chứng âm (CPE %)			Độ pha loãng huyết thanh của thỏ được gây miễn dịch để trung hòa liều gây nhiễm $10^4$ TCID <sub>50</sub>		
		NNV KH05 bất hoạt*	<i>E.coli</i> BL21/NNV*	Protein tái tổ hợp T4*	NNV KH05 bất hoạt*	<i>E.coli</i> BL21/NNV*	Protein tái tổ hợp T4*
5	98	0	0	0	ND	ND	ND
15	98	0	0	0	1/50	1/5	ND
25	98	0	0	0	1/400	1/200	1/50
35	98	0	0	0	1/800	1/1600	1/200
45	98	0	0	0	1/800	1/800	1/200
60	98	0	0	0	1/400	1/400	1/100

(\*Độ pha loãng cao nhất cho phản ứng trung hòa (không có hiệu ứng hủy hoại tế bào-CPE; ND: huyết thanh không trung hòa virus cường độc)

Huyết thanh của thỏ được tiêm các chất gây miễn dịch chứa NNV KH05 bất hoạt, *E.coli* BL21/NNV và protein tái tổ hợp T4 của NNV đều có kháng thể trung hòa virus gây bệnh hoại tử thần kinh NNV QN 02 kể từ ngày thứ 25 sau khi gây đáp ứng miễn dịch. Khả năng tạo kháng thể trung hòa với NNV QN 02 cường độc của các mẫu huyết thanh là không tương đương nhau, trong đó, lô thỏ được tiêm virus bất hoạt

đều có hiệu giá kháng thể trung hòa cao hơn hai lô còn lại. Ở ngày thứ 25, độ pha loãng huyết thanh thỏ có kháng thể trung hòa là 1:400, trong khi đó huyết thanh của lô thỏ được tiêm *E.coli* BL21/NNV trung hòa virus ở độ pha loãng 1:200, lô thỏ tiêm protein tái tổ hợp gen mã hóa kháng nguyên vỏ T4 của NNV có hiệu giá trung hòa là 1:50. Từ ngày thứ 35-45, hiệu giá trung hòa đạt giá trị cao nhất ở cả ba lô thỏ, trong đó

2 lô được tiêm NNV bất hoạt và *E.coli* BL21/NNV có độ pha loãng huyết thanh là 1:800 và 1:1600, lô được tiêm protein T4 tái tổ hợp có hiệu giá trung hòa là 1:200. Ở ngày thứ 5, cả 3 lô thí nghiệm đều chưa có kháng thể trung hòa NNV cường độc.

Các mẫu đối chứng âm, sử dụng huyết thanh có kháng thể đặc hiệu với NNV để nuôi cấy trên tế bào mẫn cảm đã không gây hiệu ứng hủy hoại tế bào. Các mẫu đối chứng dương cho thấy, huyết thanh thô bình thường không có khả năng trung hòa chủng virus gây bệnh hoại tử thần

kinh QN02 cường độc, tất cả các giếng nuôi cấy tế bào đều có CPE.

Trên mô hình *in vivo*, bên cạnh việc đánh giá trung hòa virus cường độc của huyết thanh đặc hiệu với NNV, chúng tôi còn thực hiện đánh giá khả năng nhiễm virus ở cá thí nghiệm. Đây là tiêu chí quan trọng, liên quan đến sự lưu hành của mầm bệnh trong môi trường nuôi cá đã sử dụng vaccin. Cá nhiễm bệnh được xác định bằng phản ứng RT-PCR phát hiện gen mã hóa kháng nguyên đặc hiệu.

**Bảng 2: Kết quả xác định hiệu giá kháng thể trung hòa virus gây bệnh hoại tử thần kinh ở mô hình *in vitro***

Thời gian thu huyết thanh thô sau khi gây miễn dịch (ngày)	Đối chứng dương		Đối chứng âm (tỷ lệ nhiễm bệnh-%)			Huyết thanh của thô được gây miễn dịch					
	Nhiễm bệnh (%)	Chết (%)	NNV KH05 bất hoạt	<i>E.coli</i> BL21/NNV	Protein tái tổ hợp T4	NNV KH05 bất hoạt		<i>E.coli</i> BL21/NNV		Protein tái tổ hợp T4	
5	100	100	0	0	0	ND	+	ND	+	ND	+
15	100	100	0	0	0	ND	+	ND	+	ND	+
25	100	100	0	0	0	1/100	-	1/100	-	1/50	-
35	100	100	0	0	0	1/200	-	1/00	-	1/50	-
45	100	100	0	0	0	1/200	-	1/100	-	1/50	+
60	100	100	0	0	0	1/100	-	1/50	+	1/10	+

(T4: gen mã hóa kháng nguyên đặc hiệu của NNV; ND: huyết thanh không trung hòa virus cường độc)

Kết quả trong bảng 2 chỉ ra rằng từ ngày thứ 23-35 sau khi gây miễn dịch, huyết thanh thô có khả năng trung hòa hoàn toàn NNV cường độc ở độ pha loãng huyết thanh từ 1:50-1:100, virus không được phát hiện trong não của cá thí nghiệm. Trong 3 lô thí nghiệm, hiệu giá trung hòa của lô được tiêm virus bất hoạt cao hơn hai lô còn lại, cho đến ngày thứ 60, kháng thể có trong huyết thanh vẫn trung hòa hoàn toàn chủng NNV gây bệnh.

Ở 2 lô huyết thanh thô gây miễn dịch bởi *E.coli* BL21/NNV và protein T4 tái tổ hợp, từ ngày thứ 45-60, kháng thể mặc dù đã trung hòa độc lực của virus, làm cho virus không còn khả năng gây bệnh, gây chết cá thí nghiệm nhưng vẫn có sự xâm nhiễm của virus, gen mã hóa

kháng nguyên đặc hiệu của NNV đã được phát hiện trong não cá.

Từ các kết quả này cho thấy: mặc dù mức độ tạo kháng thể trung hòa thấp hơn so với virus bất hoạt và chủng vi khuẩn biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên nhưng protein tái tổ hợp T4 cũng có khả năng tạo kháng thể trung hòa virus cường độc. Đây là kết quả khá quan, có ý nghĩa lớn trong việc lựa chọn kháng nguyên để sản xuất vaccin.

### 3.2. Đánh giá khả năng tạo kháng thể trung hòa của kháng nguyên NNV trên cá mú

Kháng nguyên của NNV có khả năng tạo kháng thể trung hòa trên thô, tuy nhiên để đánh giá được kháng nguyên này có thể sử dụng để

sản xuất vaccin hay không thì cần thực hiện đánh giá trực tiếp trên cá mú. Thí nghiệm được bố trí như sau:

- Đối chứng dương: Cá mú bột được ấp nở tại Trung tâm giống Hải sản miền Bắc, được xác định là không nhiễm NNV. Nghiền, đồng nhất cá, xử lý kháng sinh, lọc, ủ với chủng NNV cường độc QN02 rồi gây nhiễm vào tế bào GS01.

- Đối chứng âm: cá mú bột được gây miễn dịch với NNV bất hoạt, *E.coli* BL21/NNV và

protein tái tổ hợp T4. Nghiền, đồng nhất cá, xử lý kháng sinh, lọc, pha loãng theo hệ số 10 rồi gây nhiễm vào tế bào GS01.

- Lô thí nghiệm: cá mú bột được gây miễn dịch với NNV bất hoạt, *E.coli* BL21/NNV và protein tái tổ hợp T4. Nghiền, đồng nhất cá, xử lý kháng sinh, lọc, pha loãng theo hệ số 10 được ủ với chủng NNV cường độc QN02 rồi gây nhiễm vào tế bào GS01.

Kết quả trình bày trong bảng 3.

**Bảng 3: Kết quả xác định hiệu giá kháng thể trung hòa virus gây bệnh hoại tử thần kinh ở mô hình *in vitro***

Mẫu thí nghiệm	Độ pha loãng dịch chiết của cá được gây miễn dịch để trung hòa 10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub>					
	15	30	45	60	75	90
Đối chứng dương	+	+	+	+	+	+
Dịch chiết cá gây miễn dịch với NNV bất hoạt						
Dịch chiết cá gây miễn dịch với <i>E.coli</i> BL21/NNV						
Dịch chiết cá gây miễn dịch protein tái tổ hợp T4						
Dịch chiết cá gây miễn dịch với NNV bất hoạt + NNV cường độc	1:64	1:256	1:256	1:128	1:64	1:32
Dịch chiết cá gây miễn dịch với <i>E.coli</i> BL21/NNV+ NNV cường độc	1:64	1:256	1:128	1:128	1:64	1:32
Dịch chiết cá gây miễn dịch protein tái tổ hợp T4 + NNV cường độc	1:16	1:128	1:128	1:64	1:64	1:8

Kháng thể trung hòa duy trì cho đến ngày thứ 90 ở cả 3 lô thí nghiệm. Độ pha loãng dịch chiết cá mú được gây miễn dịch với NNV bất hoạt, *E.coli* BL21/NNV và protein T4 tái tổ hợp cho kháng thể trung hòa virus NNV cường độc cao nhất ở ngày thứ 30-45. Trong đó, đáp ứng miễn dịch đặc hiệu ở cá được tiêm virus bất hoạt đạt cao hơn kháng nguyên tái tổ hợp và tương đương với vi khuẩn biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên. Sự hình thành đáp ứng miễn dịch bảo hộ ở cá mú bột đối với bệnh hoại tử thần kinh cho đến ngày thứ 90 là cơ sở để triển khai sản xuất vaccin phòng bệnh bởi lẽ, virus gây bệnh chỉ tấn công và gây thất thoát cá ở giai đoạn cá bột và ấu trùng.

#### IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Virus hoại tử thần kinh NNV bất hoạt, vi khuẩn *E.coli* BL21/NNV biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên của NNV và kháng nguyên tái tổ hợp T4 của NNV có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch trên thỏ và cá mú con. Kháng thể trung hòa đạt cao nhất ở 35-45 ngày sau khi gây miễn dịch. Mức độ đáp ứng miễn dịch đặc hiệu ở cá được tiêm virus bất hoạt đạt cao hơn kháng nguyên tái tổ hợp T4 và tương đương với vi khuẩn biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên. Trên cá mú con, gen mã hóa kháng nguyên đặc hiệu của NNV được phát hiện ở các lô cá tiêm dịch phản ứng trung hòa giữa huyết thanh thỏ được miễn dịch với *E.coli* BL21/NNV, protein tái tổ hợp T4 ở

ngày thứ 45-60. Trong cá mú bột, kháng thể trung hòa vẫn được phát hiện ở ngày thứ 90 với cả 3 lô thí nghiệm, mức độ tạo đáp ứng miễn dịch mạnh nhất ở ngày thứ 30-45.

Sự hình thành kháng thể trung hòa virus hoại tử thần kinh ở cá mú bột cho đến ngày thứ 90 là cơ sở để sản xuất và ứng dụng vacxin phòng bệnh cho cá.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Thị Tâm, Phạm Công Hoạt (2011). Phát hiện, phân lập và xác định một số đặc tính của virus gây bệnh hoại tử thần kinh (*Nervous Necrosis Virus*) trên cá mú tự nhiên tại vùng biển Quảng Ninh. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, ISSN 0866-7020, số 20, 2011.
2. Phạm Thị Tâm, Phạm Công Hoạt, Nguyễn Thị Vui, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Quang Linh (2012). Xác định virus gây bệnh hoại tử thần kinh (*Nervous Necrosis Virus*) trên cá chình nuôi tại vùng biển miền Trung. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, ISSN 0866-7020, số 12, 2012.
3. Arimoto, M., Sato, J., Maruyama, K., Mimura, G., Furusawa, I., 1996. Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquacul.* 143, 15-22.
4. Breuil, G., Pepin, J.F., Castric, J., Fauvel, C. Thiery, R., 2000. Detection of serum antibodies against nodavirus in wild and farmed adult sea bass: application to the screening of brood stock in sea bass hatcheries. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 20, 95-100.
5. Christie, K.E., 1997. Immunization with viral antigens: Infectious Pancreatic Necrosis. In: Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J., Brown, F., (Eds.). *Fish Vaccinology: Developments in Biological Standardization*. Basel, Karger, 90. 191-199.
6. Husgard, S., Grotmol, S., Hjeltmes, B.K., Rodseth, O.M., Biering, E., 2001. Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Dis. Aquat. Org.* 45, 33-44.
7. Leong, J.C., Fryer, J.L., 1993. Viral vaccines for aquaculture. In: Faisal, M., Hetrick, F.M. (Eds.), *Annual Review of Fish Diseases*. Pergamon Press, New York. 3, 225-240.
8. Lorenzen, N., Olesen, N.J., 1997. Immunization with viral haemorrhagic septicaemia antigens. In: Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J., Brown, F., (Eds), *Fish Vaccinology*. Karger, Basel, New York. *Dev. Biol. Stand.* 90, pp 201-209
9. Munday, B.L., Nakai, T., 1997. Special topic review: Nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *J. Microb. Biotech.* 13, 375-381.
10. Munday, B.L., Nakai, T., Nguyen, H.D., 1994. Antigenic relationship of the picorna-like virus of larval barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch.) to the nodavirus of larval striped jack nervous necrosis (SJNNV) from brood stocks of striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider). *Australian Vet. J.* 71, 384.
11. Munday, B.L., Kwang, J., Moody, N., 2002. Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.* 25, 127-142.
12. Nakai, T., 2000. Recent advances in the diagnosis and control of viral nervous necrosis (VNN) in groupers, In: APECFWG02/ 2000. Development of a regional research program on grouper virus transmission and vaccine development, Bangkok. 18-20. October 2000.
13. Watanabe, K., Nishizawa, T., Yoshimizu, M., 2000. Selection of broodstock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.* 41, 219-223.

Nhận ngày 28/3/2013

Phản biện ngày 15/4/2013