

NGHIÊN CỨU TẠO VẮC XIN VÔ HOẠT PHÒNG BỆNH HOẠI TỬ THẦN KINH TRÊN CÁ MÚ (*Epinephelus* sp.) QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

Mẫn Hồng Phước^{1,2,*}, Phạm Thị Tâm², Đồng Văn Quyền¹, Vũ Thị Bích Huyền³, Lê Minh Hải⁴

TÓM TẮT

Bệnh hoại tử thần kinh là bệnh cấp tính, gây chết hàng loạt cá mú ở giai đoạn ấu trùng và cá bột. Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu tạo vắc xin bất hoạt phòng bệnh hoại tử thần kinh cho cá mú nuôi ở quy mô phòng thí nghiệm. Chúng vi rút gây bệnh hoại tử thần kinh TB05 được phân lập từ tỉnh Thái Bình có độc lực là $TCID_{50} = 10^{6,8}$ và $LD_{50} = 10^{7,5}$ được lựa chọn làm chủng nghiên cứu chế tạo vắc xin. Vi rút được bất hoạt bằng beta - propiolactone 0,1% 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 suất 0,2 x $TCID_{50}$, 0,5 x $TCID_{50}$ và 1 x $TCID_{50}$ đạt trên 75%. Kết quả của nghiên cứu làm tiền đề cho việc sản xuất vắc xin phòng ngừa bệnh hoại tử thần kinh cho cá mú, giúp phát triển bền vững nghề nuôi cá mú tại Việt Nam.

Từ khóa: Vắc xin, vi rút gây bệnh hoại tử thần kinh, công suất độc, bảo hộ, cá mú.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh hoại tử thần kinh (viral nervous necrosis disease - VNN) là một bệnh cấp tính và cũng là một trong những nguyên nhân chính gây ra thiệt hại lớn về kinh tế trong nghề nuôi cá biển và nuôi trồng thủy sản công nghiệp. Tác nhân VNN là vi rút thuộc giống *Betanodavirus*, họ *Nodaviridae* [12], [8], [4], [11], [9], [1]. Để phòng bệnh do vi rút gây ra thì vắc xin là biện pháp hữu hiệu. Cho đến nay, nhiều loại vắc xin phòng VNN đã được nghiên cứu và thử nghiệm. Một số loại vắc xin phòng VNN đã được phát triển như vắc xin bất hoạt, vắc xin tái tổ hợp, các loại vắc xin này đã mang lại hiệu quả nhất định [3]. Vắc xin tái tổ hợp được sử dụng trên nhiều loài cá khác nhau, như cá mú bảy dải (*Epinephelus septemfasciatus*) [15], cá mú lưng gù (*Cromileptes altivelis*) [6], cá mú đốm cam (*Epinephelus coioides*) [2] và cá chẽm châu Á (*Lates calcarifer*) [18]. Kết quả cho thấy, vắc xin tạo ra kháng thể đặc hiệu và có tỷ lệ bảo hộ dao động từ 67% đến 82% ở cá trưởng thành. Tuy nhiên, vắc xin tái tổ hợp cũng còn những hạn chế nhất định như giá thành cao, hiệu quả bảo hộ thấp [7], [14], [16].

Hiện nay, một số loại vắc xin bất hoạt phòng bệnh VNN đã được phát triển như vắc xin bất hoạt

phòng bệnh hoại tử thần kinh cho cá mú lưng gù, cá mú đốm cam [5], cá mú đốm đỏ (RGNNV), cá mú bảy dải [17] và cá mú cẩm thạch nâu (*Epinephelus fuscoguttatus*) [10]. Hiệu quả bảo hộ của các loại vắc xin này dao động từ 86% đến 100%. Mặc dù vắc xin bất hoạt đặc hiệu và hiệu quả hơn so với vắc xin tái tổ hợp trong phòng chống VNN, nhưng sự đa dạng của các chủng vi rút gây bệnh VNN đòi hỏi phải nghiên cứu lựa chọn tạo vắc xin từ chính các chủng vi rút thực địa có độ tương đồng kháng nguyên cao với các chủng vi rút gây bệnh tại mỗi nước hay mỗi khu vực. Nghiên cứu này trình bày kết quả tạo vắc xin vô hoạt phòng bệnh hoại tử thần kinh trên cá mú (*Epinephelus* sp.) từ chủng thực địa của Việt Nam ở quy mô phòng thí nghiệm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Chủng vi rút gây bệnh hoại tử thần kinh TB05 được phân lập từ mô mắt và não của cá mú nghi mắc bệnh tại Cồn Vành, Thái Bình, lưu trữ - 80°C tại Khoa Công nghệ sinh học, Viện Đại học Mở Hà Nội.

- Cá thí nghiệm: cá mú giống (*Epinephelus coioides*) (1,5 cm) được cung cấp bởi Trung tâm Quốc gia Giống hải sản miền Bắc, Xuân Đán, Cát Bà, Hải Phòng. Cá được kiểm tra không nhiễm vi rút gây bệnh hoại tử thần kinh bằng phản ứng RT - PCR và nuôi trong bể xi măng.

¹ Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Viện Đại học Mở Hà Nội

* Email: manphuc@gmail.com

³ Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

⁴ Trường Đại học Vinh

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nuôi cấy vi rút

Vi rút TB05 được nuôi bằng tế bào GS01 (Đại học Wageningen, Hà Lan). Trước khi sử dụng, tế bào được hoạt hóa trong chai nuôi cấy với môi trường Leibovitz's L - 15 có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê (Fetal Calf Serum - FCS, Sigma). Tế bào được nuôi trong tủ ẩm ở nhiệt độ 27°C, 5% CO₂ trong 2 ngày để đạt mật độ 10⁵ tế bào/ml. Sau đó lây nhiễm với chủng TB05. Theo dõi hiệu ứng huỷ hoại tế bào (Cytopathic Effect - CPE) mỗi ngày. Khi CPE đạt khoảng 90% - 95% tiến hành thu dịch vi rút khỏi chai nuôi cấy rồi ly tâm thu dịch nổi có chứa vi rút.

2.2.2. Chuẩn độ vi rút TCID₅₀ (Tissue Culture Infective Dose, 50%)

Chuẩn độ vi rút được thực hiện trên đĩa nhựa 96 giếng nuôi tế bào GS01. Dịch vi rút được pha loãng theo hệ số 10 trong dung dịch muối cân bằng Hanks (Hank's Balanced Salt Solution - HBSS). Vi rút 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 TCID₅₀ theo phương pháp của Reed và Muench (1938) [13].

$$\lg \text{TCID}_{50} = \lg A + x1 \lg f$$

$$\lg \text{TCID}_{50} = \lg A + x2 \lg f$$

Trong đó: f là hệ số pha loãng

$$x1 = \frac{50-A1}{A1-B1} \quad x2 = \frac{50-B1}{A1-B1}$$

A: độ pha loãng với tỷ lệ cận trên có bệnh tích,
A1: tỷ lệ cận trên có bệnh tích.

B: độ pha loãng với tỷ lệ cận dưới có bệnh tích,
B1: tỷ lệ cận dưới có bệnh tích.

2.2.3. Phương pháp gây bất hoạt vi rút

Đối với vắc xin vô hoạt, việc lựa chọn hóa chất làm chết mầm bệnh nhưng vẫn duy trì tính sinh miễn dịch đóng vai trò quyết định cho tính toàn vẹn của kháng nguyên cũng như độ an toàn của vắc xin. Trong nghiên cứu này, NNV được bất hoạt bằng 3 hóa chất:

+ Bất hoạt bằng formalin (formaldehyde 35%): formalin được bổ sung vào dịch vi rút 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 0,1M bổ sung vào dịch vi rút để đạt nồng độ 0,001M và 0,002M. Hỗn hợp được ủ ở 37°C/36 giờ. BEI được loại khỏi dịch bất hoạt bằng cách trung hòa với 1M Na - thiosulfate (Merck) trong 12 giờ.

+ Bất hoạt bằng beta - propiolactone: chỉnh pH của dịch vi rút 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.

Dịch vi rút TB05 sau khi bất hoạt bằng formalin, BEI, beta - propiolactone được gây miễn dịch cho thỏ 2 lần, lần 2 cách lần thứ nhất 7 ngày với liều TCID₅₀ = 10^{6,8}, định kỳ 7 ngày 1 lần sau lần gây miễn dịch đầu tiên, lấy huyết thanh thử để thực hiện phản ứng ELISA nhằm xác định khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của vi rút bất hoạt và lựa chọn hóa chất gây bất hoạt phù hợp để sản xuất vắc xin.

2.2.4. Phản ứng ELISA

Phản ứng được thực hiện với kháng thể pha loãng trong dung dịch đệm carbonate, mỗi giếng phủ 100 µl rồi ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Dịch kháng nguyên pha loãng theo tỷ lệ 1/400 trong PBS, ủ ở nhiệt độ 37°C/1 giờ, goat anti - rabbit IgG HRPO (Sigma) pha loãng 1/10.000, ủ ở nhiệt độ phòng trong 45 phút, cơ chất sinh màu TMB ủ trong 15 phút ở 37°C và dừng phản ứng bằng H₂SO₄ 1M. Đọc kết quả phản ứng trên máy đọc đĩa ELISA, bước sóng 450 nm.

2.2.5. Thí nghiệm lựa chọn chất bổ trợ của vắc xin

Dịch vi rút sau khi bất hoạt được tạo dạng keo phen với chất bổ trợ là aluminum hydroxide (AH) và aluminum phosphate (AP). Thí nghiệm đánh giá khả năng bảo hộ của vắc xin được bố trí thành 2 lô, mỗi lô 200 cá mú bột (1,5 cm) được gây miễn dịch bằng phương pháp ngâm với vắc xin vô hoạt bổ sung keo phen với AH hoặc AP, thời gian 10 phút có sục khí, sử dụng vắc xin 2 lần, mỗi lần cách nhau 10 ngày. Lô đối chứng, cá được ngâm với giả được (keo phen AH hoặc AP).

Cá mú bột sau khi sử dụng vắc xin được nuôi trong điều kiện ổn định về nhiệt độ 25°C - 27°C và nồng độ muối 25‰ - 30‰. Theo dõi cá trong 30 ngày để đánh giá mức độ an toàn và thực hiện thí nghiệm đánh giá hiệu quả bảo hộ của vắc xin.