

Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch dịch thể của thỏ với chủng porcine circovirus type 2 (PCV2) phân lập tại Việt Nam

Huỳnh Thị Mỹ Lệ*, Nguyễn Văn Giáp, Lê Văn Phan,
Cao Thị Bích Phượng, Trịnh Đình Thâu

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 12/1/2016, ngày chuyển phản biện 18/1/2016, ngày nhận phản biện 10/3/2016, ngày chấp nhận đăng 8/5/2016

Nghiên cứu này thực hiện trên động vật thí nghiệm nhằm kiểm tra tính kháng nguyên của một số chủng Porcine circovirus type 2 (PCV2) phân lập từ lợn tại Việt Nam được lựa chọn làm giống gốc để sản xuất vaccin. Kết quả cho thấy, 3 chủng virus lựa chọn số 03, 04 và 07 (có hiệu giá virus $\geq 10^5$ TCID₅₀/0,1 ml) đã kích thích sản sinh đáp ứng miễn dịch ở thỏ thí nghiệm. Kháng thể đặc hiệu kháng PCV2 được hình thành trong vòng 14 ngày kể từ sau khi tiêm kháng nguyên, với độ dài miễn dịch tối thiểu là 56 ngày. Thỏ được gây miễn dịch bằng chủng PCV2 ở các lần tiếp đời khác nhau không dẫn đến khác biệt về quy luật hình thành kháng thể cũng như khả năng trung hòa virus.

Từ khóa: *đáp ứng miễn dịch, Porcine circovirus type 2, thỏ.*

Chỉ số phân loại 4.6

Studying the humoral immune responses of rabbit to porcine circovirus type 2 (PCV2) isolated from pigs of Vietnam

Summary

This study aimed to evaluate the immunogenicity of several isolates of porcine circovirus type 2 (PCV2) from pigs of Vietnam which are candidates for master seed selection. The experiments were done with 3 isolates having titer $\geq 10^5$ TCID₅₀/0.1 ml (namely isolate number 03, 04, and 07). All of immunized rabbits were able to produce specific antibodies against PCV2 which appeared around 14 days of post-immunization, and prolonged at least 56 days. Rabbits immunized by PCV2 of different passaging levels elicited humoral immune responses in similar manner as well as the viral neutralizing properties.

Keywords: *immune response, porcine circovirus type 2, rabbit.*

Classification number 4.6

Đặt vấn đề

Ngành chăn nuôi lợn trên thế giới và ở Việt Nam đang phải đối mặt với tình hình dịch bệnh diễn biến rất phức tạp. Có nhiều bệnh mới nổi gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng, trong đó phải kể đến hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS), bệnh đường hô hấp phức hợp ở lợn (porcine respiratory disease complex - PRDC), bệnh do porcine circovirus type 2 (PCV2) gây ra (Porcine circovirus associated disease - PCVAD)... Để chủ động trong công tác phòng chống bệnh truyền nhiễm, bên cạnh công tác vệ sinh phòng bệnh thì việc sử dụng vaccin tạo miễn dịch chủ động là rất cần thiết. Với cơ chế sinh bệnh của virus PRRS và PCV2 thường gây suy giảm miễn dịch, tạo điều kiện để các mầm bệnh kế phát gây bệnh nên sử dụng vaccin phòng các bệnh này cho đàn lợn đang được các bác sĩ thú y và chủ trang trại quan tâm. Tại Việt Nam, trước tình hình dịch bệnh diễn biến rất phức tạp như hiện nay, nhu cầu sử dụng vaccin nhằm tạo miễn dịch chủ động đặc hiệu để phòng bệnh đang là vấn đề thời sự, trong đó phải kể đến vaccin phòng bệnh do PCV2 gây ra.

Vaccin phòng bệnh do PCV2 ở Việt Nam đều là vaccin ngoại nhập, hiện chưa có một cơ sở trong nước nào sản xuất được. Vì vậy, việc nghiên cứu để sản xuất vaccin phòng bệnh do PCV2 là thực sự cần thiết, đặc biệt

*Tác giả liên hệ: huynhtmle@yahoo.com

là những nghiên cứu sử dụng các chủng virus phân lập được từ đàn lợn tại Việt Nam. Nhằm đáp ứng đòi hỏi của thực tiễn sản xuất, nhóm nghiên cứu đề tài cấp nhà nước mã số KC04.22/11-15 đã tiến hành lựa chọn chủng virus PCV2 đảm bảo đủ tiêu chuẩn làm giống gốc để chế vaccin phòng bệnh. Một trong những tiêu chí để đánh giá chất lượng của chủng virus làm giống gốc là phải có tính kháng nguyên. Trước khi tiến hành thử nghiệm trên bản động vật, chúng tôi đã thử nghiệm để kiểm tra tính kháng nguyên của virus trên động vật thí nghiệm. Trong khuôn khổ của bài báo này, chúng tôi cung cấp thông tin về kết quả xác định tính kháng nguyên của chủng virus PCV2 được lựa chọn làm giống gốc để sản xuất vaccin dựa trên kết quả nghiên cứu khả năng đáp ứng miễn dịch của thỏ sau khi tiêm thử nghiệm với virus PCV2.

Nội dung nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu này nhằm kiểm tra tính kháng nguyên của một số chủng PCV2 được lựa chọn làm giống gốc để sản xuất vaccin thông qua đánh giá đáp ứng miễn dịch dịch thể và khả năng trung hòa virus.

Nguyên liệu

- Thỏ trắng New Zealand, cân nặng 2,2-2,5 kg/con, khỏe mạnh, không có kháng thể kháng PCV2 và âm tính với PCV2.

- 3 chủng PCV2 thuần khiết: chủng số 03 (đời 18, đời 25), 04 (đời 20, đời 26) và 07 (đời 16, đời 20) được cô đặc bằng siêu ly tâm và vô hoạt bằng binary ethyleneimine ở nồng độ 0,2% trong vòng 24 giờ ở 37°C. Virus sau vô hoạt được điều chỉnh ở nồng độ protein 0,5 mg/ml, nhũ hóa bằng Freund's Adjuvant (complete) theo tỷ lệ 1: 1. Kháng nguyên sau gây nhũ được bảo quản ở 4°C và được cân bằng ở nhiệt độ phòng khi tiêm cho thỏ.

- Huyết thanh của thỏ (i) được gây miễn dịch bởi các đời PCV2 khác nhau và (ii) ở các ngày khác nhau sau gây miễn dịch.

- Bộ kit ELISA: SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking (Synbiotics, Mỹ).

- Bộ kit IFA đặc hiệu cho PCV2: VDPPro® PCV2 FA Reagent (Median Diagnostics, Hàn Quốc).

- Tế bào dòng PK15 và môi trường nuôi cấy tế bào

DMEM bổ sung 5% FBS.

Phương pháp

Phương pháp gây miễn dịch cho thỏ:

Trước khi gây miễn dịch, toàn bộ thỏ được đánh số tai, nuôi thích nghi và theo dõi thân nhiệt trong vòng 7 ngày. Thỏ thí nghiệm được gây miễn dịch bằng 2 ml kháng nguyên (đã nhũ hóa) theo hai đường đưa kháng nguyên: tiêm nội bì (1 ml/100 vị trí tiêm) và tiêm dưới da (1 ml/6 vị trí tiêm). Thỏ sau gây miễn dịch được theo dõi thân nhiệt hàng ngày (vào thời điểm cố định) và những bất thường khác.

Thỏ thí nghiệm được lấy máu xét nghiệm tại thời điểm gây miễn dịch (D0), và cứ 7 ngày/lần (D7, D14, D21, D28, D35, D42, D49, D56...). Mẫu huyết thanh được để đông tự nhiên, ly tâm thu huyết thanh và bảo quản ở -20°C.

Phương pháp blocking ELISA phát hiện kháng thể kháng PCV2:

Các bước thực hiện phản ứng blocking ELISA phát hiện kháng thể đặc hiệu kháng PCV2 trong mẫu huyết thanh của thỏ gồm: 1) Pha loãng huyết thanh: huyết thanh chuẩn đoán được pha loãng 1/100 trong dung dịch pha loãng mẫu; 2) Ủ mẫu: ủ đĩa ở 37°C/60 phút ($\pm$ 5 phút), tránh ánh sáng, rửa 4 lần, 200 μ l/lần bằng dung dịch rửa; 3) Cho kháng thể đặc hiệu gắn enzyme; 4) Cho cơ chất/chất màu (Buffered peroxidase substrate): cho 100 μ l cơ chất/chất màu vào mỗi giếng của đĩa ELISA, để ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng trong vòng 20 phút; 5) Dừng phản ứng: thêm 50 μ l dung dịch H₂SO₄ 2N để dừng phản ứng; 6) Đo giá trị OD, tính toán kết quả: giá trị OD đo ở bước sóng 450 nm. Phản ứng được đánh giá hợp lệ nếu giá trị OD trung bình của đối chứng âm > 0,800, và giá trị OD trung bình của đối chứng dương < 0,600.

Tính giá trị S/N (OD giữa mẫu và đối chứng âm). Các bước tính toán được thực hiện trên bảng tính Excel cung cấp bởi nhà sản xuất. Nếu S/N $\leq$ 0,4, mẫu được coi dương tính huyết thanh học. Ngược lại, nếu S/N > 0,4, mẫu được coi âm tính huyết thanh học.

Phương pháp xác định sự có mặt của kháng thể trung hòa:

Phương pháp trung hòa virus được thực hiện theo [1], với các bước thực hiện được tóm tắt như sau:

Bước 1: chuẩn bị huyết thanh: huyết thanh thô được diệt bổ thể ở 56°C/30 phút, và pha loãng trong môi trường DMEM ở độ pha loãng 1/4 (25% huyết thanh).

Bước 2: chuẩn bị huyền dịch virus: virus PCV2 có chuẩn độ 10^4 TCID₅₀/ml được pha loãng 100 lần trong môi trường DMEM (mức pha loãng cho phép đếm được số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu).

Bước 3: trung hòa virus: trộn 100 µl huyết thanh (25%) với 100 µl virus. Sau khi ủ 1 giờ ở 37°C, chuyển 100 µl huyền dịch huyết thanh: virus vào mỗi giếng tế bào của đĩa 96 giếng, tiếp tục ủ ở 37°C/5% CO₂ trong 1 giờ. Loại bỏ hoàn toàn huyền dịch huyết thanh: virus và rửa các giếng bằng 200 µl PBS 1X. Bổ sung môi trường duy trì (DMEM 5% FBS). Sau 36 giờ duy trì, thực hiện phản ứng IFA để đánh giá sự nhân lên của PCV2 bằng cách đếm số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu. So sánh số lượng tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu giữa mẫu huyết thanh của thỏ được gây miễn dịch với đối chứng virus. Nếu có sự giảm về số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu, chứng tỏ có mặt của kháng thể trung hòa trong mẫu huyết thanh xét nghiệm.

Phương pháp miễn dịch huỳnh quang phát hiện PCV2 trên thăm tế bào:

Các bước thực hiện phản ứng IFA xác định sự nhân lên của PCV2 được thực hiện như sau: 1) Cố định tế bào sau gây nhiễm: loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy trong giếng. Rửa 3 lần bằng dung dịch PBS 1X, 200 µl/giếng/lần. Để khô đĩa tự nhiên trong tủ an toàn sinh học. Thêm 200 µl cồn tuyệt đối/giếng và cố định ở -20°C trong vòng 2 giờ. Loại bỏ hoàn toàn cồn. 2) Hydrat hóa tế bào: nhỏ 200 µl PBS 1X ngập thăm tế bào và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. 3) Ủ kháng thể đặc hiệu: nhỏ 100 µl kháng thể đơn dòng kháng PCV2 (1X anti-PCV2 mAb). Ủ ở 37°C/60 phút. Loại bỏ kháng thể thừa bằng cách rửa giếng bằng dung dịch rửa 200 µl/giếng/lần, lặp lại 2 lần. 4) Ủ kháng thể gắn FITC: nhỏ ngập thăm tế bào kháng thể gắn huỳnh quang (1X FITC anti-mouse conjugate) và ủ 37°C/60 phút. Loại bỏ kháng thể thừa, thấm khô rồi nhỏ 100 µl mounting buffer/giếng. 5) Đọc kết quả: quan sát tế bào bằng vật kính thông thường để nhìn thấy rõ ảnh tế bào, sau đó chuyển sang chế độ UV để quan sát tín hiệu huỳnh quang.

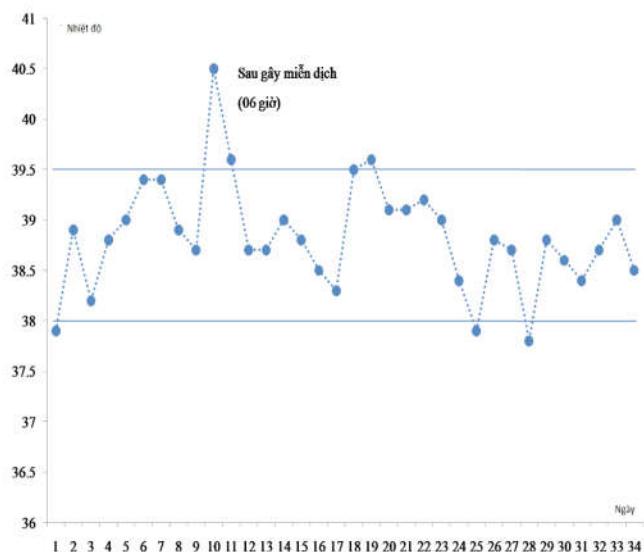
Phương pháp xử lý số liệu:

Phân tích sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm bằng phân tích phương sai một nhân tố (ANOVA một nhân tố), thực hiện trên phần mềm MS Excel 2007.

Kết quả và thảo luận

Kết quả theo dõi tình trạng của thỏ sau gây miễn dịch

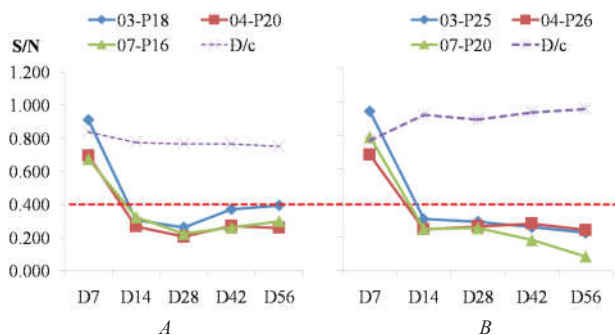
Toàn bộ thỏ trước khi gây miễn dịch được sàng lọc bằng phản ứng PCR và blocking ELISA để lựa chọn cá thể âm tính với PCV2 và không có kháng thể kháng PCV2. Theo dõi thân nhiệt của 8 thỏ thí nghiệm trong vòng 30 ngày sau khi gây miễn dịch, chúng tôi thấy nhiệt độ của thỏ dao động trong khoảng 37,8°C đến 40,5°C (hình 1). Theo [2], thân nhiệt bình thường của thỏ dao động từ 38,5 đến 39,5°C thì thỏ thí nghiệm có hiện tượng tăng thân nhiệt (39,3÷40,5°C) sau khi tiêm kháng nguyên khoảng 6 giờ; tuy nhiên thân nhiệt trở lại bình thường vào các ngày tiếp theo. Trong quá trình theo dõi thỏ thí nghiệm, chúng tôi không quan sát thấy những bất thường ở cục bộ vị trí tiêm cũng như hiện tượng thỏ ủ rũ, bỏ ăn...



Hình 1: thân nhiệt của thỏ trước và sau khi gây miễn dịch

Kết quả đánh giá đáp ứng miễn dịch của thỏ bằng phản ứng ELISA

Nhóm nghiên cứu đã thực hiện phản ứng blocking ELISA với các mẫu huyết thanh của thỏ được gây miễn dịch bởi 3 chủng PCV2 (chủng virus số 03 đời 18, số 04 đời 20 và số 07 đời 16) ở các ngày D7 đến D56. Kết quả nghiên cứu biến động hiệu giá kháng thể đặc hiệu kháng PCV2 được trình bày ở hình 2.



Hình 2: biến động hiệu giá kháng thể của thỏ sau gây miễn dịch với các chủng PCV2

Kết quả trình bày ở hình 2A biểu diễn giá trị S/N của mỗi mẫu huyết thanh, với giá trị ngưỡng dương tính/âm tính là 0,4. Kết quả cho thấy, tại thời điểm 7 ngày sau khi gây miễn dịch (D7) các mẫu xét nghiệm đều âm tính huyết thanh học với kháng thể kháng PCV2. Ở mẫu đối chứng (không tiêm kháng nguyên PCV2), tại tất cả các thời điểm xét nghiệm (từ D7 đến D56) đều cho kết quả âm tính huyết thanh học với kháng thể kháng PCV2.

Tại thời điểm D14, toàn bộ các mẫu xét nghiệm (được gây miễn dịch bởi 3 chủng PCV2) đều dương tính huyết thanh học (giá trị S/N < 0,4). Như vậy, 3 chủng PCV2 dùng trong nghiên cứu này đều có tính sinh miễn dịch và hiện tượng chuyển dương tính huyết thanh học diễn ra trong thời gian từ 7 đến 14 ngày kể từ thời điểm tiêm kháng nguyên. Về độ dài miễn dịch, sau thời điểm tiêm 56 ngày, toàn bộ thỏ thí nghiệm vẫn dương tính huyết thanh học với kháng thể kháng PCV2.

Kết quả phân tích biến động hàm lượng kháng thể kháng PCV2 của thỏ được gây miễn dịch bởi 3 chủng PCV2 ở các lần tiếp đời cao (chủng virus số 03 đời 25, số 04 đời 26 và số 07 đời 20) được trình bày ở hình 2B.

Kết quả trình bày ở hình 2B cho thấy, đối với thỏ đối chứng (không gây miễn dịch), tại mọi thời điểm xét nghiệm (D7 đến D56) đều âm tính huyết thanh học với kháng thể kháng PCV2. Trong khi đó, các thỏ được gây miễn dịch bởi 3 chủng PCV2 ở các lần tiếp đời cao (so với kết quả trình bày ở hình 2A), đều có khả năng kích thích sản sinh đáp ứng miễn dịch dịch thể đặc hiệu. Hiện tượng chuyển dương tính huyết thanh học xảy ra trong khoảng 7 đến 14 ngày sau khi gây miễn dịch. Các thỏ được gây miễn dịch bằng 3 chủng PCV2

có cũng có độ dài miễn dịch ít nhất đến 56 ngày sau tiêm kháng nguyên.

Trong tự nhiên, thỏ được xác định là loài không miễn cảm với Porcine circovirus [3]. Kết quả phơi nhiễm PCV2 cho thỏ qua đường hô hấp đều không phát hiện thấy sự nhân lên của virus và hiện tượng chuyển dương tính huyết thanh học [4]. Trong điều kiện thí nghiệm, thỏ chủ yếu được gây tối miễn dịch nhằm mục đích tạo kháng thể đa dòng dùng trong chẩn đoán PCV2 [5]. Do vậy, có rất ít các công bố liên quan tới đáp ứng miễn dịch dịch thể của thỏ kháng lại PCV2. Trong thí nghiệm này, khi so sánh giá trị S/N của mỗi chủng PCV2, ở các đời khác nhau (hình 2A và 2B), chúng tôi nhận thấy có sự sai khác về giá trị tuyệt đối. Tuy nhiên, kết quả kiểm định bằng phân tích phương sai một nhân tố (ANOVA một nhân tố) đều có giá trị F thực nghiệm lớn hơn F lý thuyết. Nói cách khác, sự sai khác về giá trị tuyệt đối S/N là không có ý nghĩa thống kê. Cụ thể, giữa chủng 03 đời 18 và đời 25 có F thực nghiệm = 0,065 < F lý thuyết = 5,318; giữa chủng 04 đời 20 và đời 26 có F thực nghiệm = 0,000 < F lý thuyết = 5,318; giữa chủng 07 đời 16 và đời 20 có F thực nghiệm = 0,094 < F lý thuyết = 5,317. Với các kết quả trình bày ở trên, nhóm nghiên cứu thấy rằng, cả chủng PCV2 số 03, 04 và 07 đều có khả năng kích thích sản sinh đáp ứng miễn dịch đặc hiệu trên thỏ. Cùng một chủng virus, khi gây miễn dịch cho thỏ ở các đời khác nhau, không phát hiện thấy có khác biệt về quy luật hình thành kháng thể.

Kết quả đánh giá đáp ứng miễn dịch của thỏ bằng phản ứng trung hòa

Kết quả nghiên cứu đáp ứng miễn dịch của thỏ với các chủng PCV2 bằng phương pháp blocking ELISA cho thấy, dương tính huyết thanh học xuất hiện sau gây miễn dịch khoảng 14 ngày và kéo dài ít nhất tới ngày 56 (thời điểm dừng thí nghiệm). Kết quả cũng cho thấy, hàm lượng kháng thể ở các ngày D28 đến D56 có sự biến đổi ít. Do vậy, nghiên cứu lựa chọn huyết thanh thỏ ở ngày D28 để thực hiện phản ứng trung hòa virus. Mỗi mẫu huyết thanh: virus được gây nhiễm vào 4 giếng tế bào. Chúng tôi đánh giá khả năng trung hòa virus thông qua việc xác định số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu (nếu kháng thể đặc hiệu không trung hòa virus sẽ không làm giảm số lượng tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu). Kết quả của phản ứng trung hòa được trình bày ở bảng 1 và bảng 2.

Bảng 1: kết quả trung hòa virus của mẫu huyết thanh thỏ gây miễn dịch với các chủng PCV2 (virus số 03 đời 18, số 04 đời 20 và số 07 đời 16)

Giống	Huyết thanh thỏ gây miễn dịch			Virus
	Chủng số 03 đời 18	Chủng số 04 đời 20	Chủng số 07 đời 16	
A	2	0	1	50
B	6	3	1	96
C	6	1	4	80
D	6	8	5	68
Trung bình	5	3	2,75	73,5

Ghi chú: chữ số trong bảng là số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu (nhiễm virus)

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, có sự khác nhau rất rõ rệt về số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu (tế bào nhiễm virus) ở mẫu huyết thanh so với mẫu đối chứng virus. Kết quả phân tích phương sai một nhân tố cho giá trị F thực nghiệm = 49,18 lớn hơn so với giá trị F lý thuyết = 3,49 ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$. Nói cách khác, sự sai khác về số tế bào nhiễm PCV2 là có ý nghĩa thống kê. Kết quả tính mức giảm số tế bào nhiễm virus cho thấy, huyết thanh của thỏ được gây miễn dịch bằng chủng PCV2 số 03 (đời 18), chủng 04 (đời 20), chủng 07 (đời 16) làm giảm lần lượt 14,7 lần; 24,5 lần và 26,7 lần số tế bào nhiễm virus so với đối chứng. Như vậy, huyết thanh thỏ được gây miễn dịch bằng 3 chủng PCV2 trong nghiên cứu này đều có khả năng trung hòa virus.

Kết quả nghiên cứu sự có mặt của kháng thể trung hòa trong huyết thanh thỏ được gây miễn dịch bởi 3 chủng PCV2 ở các lần tiếp đời cao (≥ 20 đời) (chủng virus số 03 đời 25, số 04 đời 26 và số 07 đời 20) được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: kết quả trung hòa virus của mẫu huyết thanh thỏ gây miễn dịch với các chủng PCV2 (chủng virus số 03 đời 25, số 04 đời 26 và số 07 đời 20)

Giống	Huyết thanh thỏ gây miễn dịch			Virus
	Chủng số 03 đời 25	Chủng số 04 đời 26	Chủng số 07 đời 20	
A	7	7	4	36
B	1	0	9	92
C	6	3	4	72
D	0	2	3	60
Trung bình	3,5	3	5	65

Ghi chú: chữ số trong bảng là số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu (nhiễm virus)

Kết quả trình bày ở bảng 2 cũng cho thấy sự khác nhau về số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu (tế

bào nhiễm virus) ở mẫu huyết thanh so với mẫu đối chứng virus. Kết quả phân tích phương sai một nhân tố cho giá trị F thực nghiệm = 25,99 lớn hơn so với giá trị F lý thuyết = 3,49, ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$. Như vậy, sự sai khác về số tế bào nhiễm PCV2 là có ý nghĩa thống kê. Kết quả tính mức giảm số tế bào nhiễm virus cho thấy, huyết thanh của thỏ được gây miễn dịch bằng chủng PCV2 số 03 (đời 25), chủng 04 (đời 26), chủng 07 (đời 20) làm giảm lần lượt 18,6 lần; 21,67 lần và 13 lần số tế bào nhiễm virus so với đối chứng virus. Như vậy, huyết thanh thỏ được gây miễn dịch bằng 3 chủng PCV2 dùng trong nghiên cứu này ở lần tiếp đời ≥ 20 đều có khả năng trung hòa PCV2.

So sánh kết quả trình bày ở bảng 1 và bảng 2, chúng tôi thấy có sự khác nhau về giá trị tuyệt đối của số tế bào nhiễm virus ở các mẫu huyết thanh thỏ được gây miễn dịch bởi cùng một virus ở các đời khác nhau. Tuy nhiên, kiểm định bằng phân tích phương sai một nhân tố cho thấy, giá trị F thực nghiệm = 0,52 nhỏ hơn giá trị F lý thuyết = 2,77 (ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$). Do vậy, sự sai khác này là không có ý nghĩa thống kê. Từ kết quả trình bày ở bảng 1 và bảng 2, chúng tôi kết luận rằng, cùng một chủng PCV2, ở các lần tiếp đời khác nhau đều có khả năng kích thích thỏ thí nghiệm sản sinh đáp ứng miễn dịch có khả năng trung hòa PCV2.

Kết luận

Từ các kết quả nêu trên, chúng tôi rút ra một số kết luận về đặc tính sinh miễn dịch của 3 chủng giống PCV2 được khảo sát trong nghiên cứu này như sau:

- Các chủng PCV2 dùng trong nghiên cứu này có khả năng kích thích sản sinh đáp ứng miễn dịch trong vòng 14 ngày kể từ sau khi tiêm vaccin, với độ dài miễn dịch tối thiểu là 56 ngày.

- Gây miễn dịch cho thỏ bằng chủng PCV2 số 03, 04 và 07 ở các lần tiếp đời khác nhau không gây ra khác biệt về quy luật hình thành kháng thể.

- Huyết thanh của thỏ được gây miễn dịch bằng 3 chủng PCV2 phân lập được ở Việt Nam có khả năng trung hòa PCV2.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ của Bộ KH&CN, Văn phòng Các chương trình KH&CN trọng điểm cấp nhà nước đã ủng hộ chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] P. Meerts, Gerald Misinzo, David Lefebvre, Jens Nielsen, Anette Bøtner, Charlotte S. Kristensen and Hans J. Nauwynck (2006), “Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease”, *BMC Veterinary Research*, pp.2-6.
- [2] Nguyễn Xuân Tịnh, Tiết Hồng Ngân, Nguyễn Bá Mùi, Lê Mộng Loan (1996), *Sinh lý học gia súc*, Nxb Nông nghiệp, trang 227.
- [3] G.M. Allan, K.V. Phenix, D. Todd, M.S. McNulty (1994), “Some Biological and Physico-Chemical Properties of Porcine Circovirus”, *J. Vet. Med*, **B41**, pp.17-26.
- [4] J. Quintana, Munica Balasch, Joaquim Segales, Maria Calsamiglia, M. Gabriela, Rodriguez-Arrioja, Juan Plana-Duran, Mariano Domingo (2002), “Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in rabbits and mice”, *Vet. Res*, **33**, pp.229-237.
- [5] S.D. Sorden, A. Perry Harms, Porntippa Nawagitgul, David Cavanaugh, Prem S. Paul (1999), “Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue”, *J. Vet Diagn Invest*, **11**, pp.528-530.