

Nghiên cứu khả năng gây bệnh và gây đáp ứng miễn dịch của virus gây bệnh hoại tử thần kinh trên cá mú nuôi ở Việt Nam

Phạm Thị Tâm¹, Phạm Công Hoat², Nguyễn Thị Thu Hiền¹, Vũ Tiến Lâm³, Nguyễn Thị Vui⁴ và Nguyễn Thị Thanh⁴

Tóm tắt

8 chủng virus gây bệnh hoại tử thần kinh (NNV) được sử dụng để nghiên cứu khả năng gây bệnh và gây đáp ứng miễn dịch trên cá mú nuôi ở Việt Nam. Các chủng virus này có độc lực khác nhau khi đánh giá mức độ gây bệnh trên tế bào mỡ cảm và cá mú con, với giá trị TCID₅₀ đạt từ 10^{-2,7}-10^{-3,9}, LD₅₀ đạt từ 10^{-1,5}-10^{-7,5}. Trong đó 4 chủng NNV ký hiệu QN 02, QN 05, QN 07, KH 05 đã được xác định có độc lực mạnh, gây chết 100% cá sau 3 ngày gây nhiễm. Đánh giá khả năng gây miễn dịch của các chủng virus này đã xác định được chủng KH 05 có tính đại diện kháng nguyên cao nhất, chủng này bị bất hoạt bởi formalin 0,3%. NNV KH 05 được nhũ hóa bằng Montanide ISA 70 có thể tạo kháng thể trung hòa với NNV cường độc ở ngày thứ 15 trên thỏ và kháng thể bảo hộ trên cá là 80- 85% ở ngày thứ 20 sau khi gây miễn dịch. Kết quả này là cơ sở để sản xuất vacxin phòng bệnh hoại tử thần kinh.

Từ khóa: Cá mú, Virus gây bệnh hoại tử thần kinh (NNV), TCID₅₀, LD₅₀, Kháng thể trung hòa, Kháng thể bảo hộ

Study on the pathogenicity and immune response of Nervous Necrosis Virus (NNV) in grouper culture in Vietnam

Pham Thi Tam, Pham Cong Hoat, Nguyen Thi Thu Hien, Vu Tien Lam, Nguyen Thi Vui and Nguyen Thi Thanh
Summary

Eight strains of *Nervous Necrosis Virus* (NNV) were used to study on pathogenicity and inducing immune response in grouper being cultured in Vietnam. These virus strains having different virulences obtained through assessment of pathogenous levels in susceptible cells and grouper fry/fingerlings, with index TCID₅₀ reached from 10^{-2,7} to 10^{-3,9}, index LD₅₀ reached from 10^{-1,5} to 10^{-7,5}. Of which, four NNV strains namely QN 02, QN 05, QN 07, KH 05 were determined to have high virulence, causing 100 % groupers died after 3 post infection. Evaluation of inducing immune response of these virus strains was determined that KH 05 virus strain was highest antigen representative. This virus strain was inactivated by formalin 0.3 %, NNV KH 05 was emulsified by Montanide ISA 70 that could generate antibody, neutralized with high virulence NNV at day 15th in rabbits and antibody protected 80 – 85 % in groupers at day 20th after inducing immunity. This result could be used as basis for producing vaccine against VNN disease.

Key words: Grouper, Nervous Necrosis Virus (NNV), TCID₅₀, LD₅₀, Neutralizing antibody, Protective antibody

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Viện Đại học Mở Hà Nội

² Bộ Khoa học và Công nghệ

³ Công ty Cổ phần phát triển Công nghệ Nông thôn-RTD

⁴ Khoa Nông lâm ngư, trường Đại học Vinh

I. Đặt vấn đề

Bệnh hoại tử thần kinh (*Viral Nervous necrosis-VNN*) do *Nervous Necrosis Virus- NNV* là bệnh cấp tính, xuất hiện trên 22 loài cá, trong đó có các loài: cá mú (*Epinephelus sp.*), cá chình (*Anguilla anguilla*), cá chẽm (*Lates calcarifer*), cá giò (*Racycentron canadum*). Bệnh chủ yếu trên cá giống, gây tỷ lệ chết có thể lên đến 90 – 100%. Ở Việt Nam, virus này đã được phát hiện thấy trên cá mú ngoài tự nhiên và cá chình nước ngọt [1,2].

Hầu hết những nghiên cứu về VNN đều cho thấy: mô đích của NNV là hệ thần kinh trung ương (gồm não và tuỷ 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 [4].

Hiện tại, việc phòng bệnh hoại tử thần kinh được thực hiện theo 2 hướng: Loại trừ con giống mang mầm bệnh và sử dụng vaccin [3]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích xác định khả năng gây đáp ứng miễn dịch của NNV trên cá mú để làm cơ sở cho sản xuất vaccin sau này.

II. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

8 chủng NNV ký hiệu là QN 02, QN 05, QN 07, HP 11, NĐ 01, NĐ 11, KH 05, KH 09 phân lập được từ cá mú mắc bệnh hoại tử thần kinh (VNN) thu thập từ các vùng biển Quảng Ninh, Hải Phòng, Nam Định, Khánh Hòa.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Nuôi cấy virus trên tế bào

NNV được nuôi bằng tế bào GS 1 (grouper spleen). Trước khi sử dụng, tế bào được hoạt hóa trong chai nuôi cấy với môi trường Leibovitz's L-15 (L 15) có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê (FCS). Tế bào được nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ 27°C, 5% CO₂ trong 2 ngày để đạt mật độ 10⁵ tế bào/ml.

Mẫu NNV được lây nhiễm trên tế bào GS 01 đã hoạt hóa. Chai đối chứng chỉ có tế bào GS và môi trường L-15 có bổ sung 10% FCS.

Theo dõi hiệu ứng huỷ hoại tế bào (CPE-cytopathic effect) mỗi ngày. Khi CPE đạt khoảng 90-95% thu dịch virus khỏi chai nuôi cấy rồi ly tâm thu dịch nổi có chứa virus.

2.2.2. Chuẩn độ virus

* TCID₅₀

Chuẩn độ virus được thực hiện trên đĩa nhựa 96 giếng nuôi tế bào GS 1.

Dịch virus được tiến hành pha loãng theo hệ số 10 trong môi trường Hank's rồi bổ sung vào các giếng tế bào. 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 hiện CPE trong vòng 5 ngày để xác định TCID₅₀ theo phương pháp của Reed và Muench.

* LD₅₀

Cá mú con có kích thước 1,5 cm được chia thành 8 lô, mỗi lô 30 con gây nhiễm với 8 chủng VNN phân lập được từ các vùng biển Quảng Ninh, Hải Phòng, Nam Định, Khánh Hòa, Bình Thuận. Lô đối chứng được tiêm Leibovitz's L-15 10%.

+Phương pháp gây nhiễm: Dịch virus được pha loãng theo hệ số 10 trong môi trường Leibovitz's L-15 rồi tiêm 0,1ml/con.

+ Vị trí tiêm: Dưới gốc vây đuôi.

+ Thời gian theo dõi cá: bắt đầu từ 6 giờ đến 15 ngày sau khi gây nhiễm.

Sau tiêm truyền, quan sát các biểu hiện lâm sàng, tỷ lệ chết, kiểm tra gen mã hóa kháng nguyên bề mặt.

LD₅₀ được tính dựa theo phương pháp của Reed và Muench (1938).

2.2.3. Phương pháp gây bất hoạt virus

NNV được bất hoạt bởi formalin với 3 nồng độ: 0,1%; 0,3%; 0,5% ở nhiệt độ 37°C trong 12h. Sau 12h trung hòa formalin bằng sodium phosphate, thực hiện lắc dịch liên tục trong 24 giờ.

2.2.4. Phương pháp RT-PCR

ARN tổng số của NNV được tách bằng kit RNA extraction (Qiagen). ADN bổ sung được tạo thành từ phản ứng RT-PCR với bộ kit RT-PCR (Invitrogen) và cặp mồi PCR F1-R3 [4] (5'-GGATTTGGACGTGCGACCAA-3'; 5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3') (Invitrogen). Phản ứng được thực hiện với 30 chu kỳ theo các chu trình nhiệt: 90°C/5 phút, 55°C/45 giây, 72°C/1 phút. Sau đó, phản ứng được tiếp tục ở 72°C/10 phút.

2.2.5. Phương pháp ELISA trực tiếp

Phản ứng được thực hiện với kháng thể pha loãng trong dung dịch đệm carbonate, mỗi giếng phủ 100µl 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 450nm.

III. Kết quả nghiên cứu

3.1 Nghiên cứu khả năng gây nhiễm của NNV

3.1.1 Xác định liều TCID₅₀ của NNV trên tế bào mẫn cảm

Liều TCID₅₀ của 8 chủng NNV thí nghiệm được xác định dựa trên mức độ hủy hoại tế bào GS 1 sau 5 ngày gây nhiễm. Kết quả trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả gây nhiễm virus trên tế bào GS 01

STT	Ký hiệu mẫu	CPE theo các độ pha loãng virus (%)										TCID ₅₀
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹		
1	QN 02	100	100	98	85	80	70	50	25	10	10 ^{-6,9}	
2	QN 05	100	100	95	80	70	60	48	25	10	10 ^{-6,8}	
6	QN 07	100	100	95	80	70	60	48	25	10	10 ^{-6,8}	
8	HP 11	70	70	60	50	35	20	5	±	±	10 ^{-3,9}	
9	NĐ 01	100	100	95	80	70	60	48	25	10	10 ^{-6,8}	
12	NĐ 11	95	95	80	75	60	52	35	20	5	10 ^{-5,9}	
17	KH 05	100	100	95	80	70	60	48	25	10	10 ^{-6,8}	
19	KH 09	60	60	50	40	15	5	+	-	-	10 ⁻³	
25	HP 11	55	55	50	30	15	5	±	-	-	10 ^{-2,7}	

3.1.2. Kết quả xác định liều gây chết và gây nhiễm 50% (LD₅₀) trên cá mú

8 chủng virut phân lập được từ các vùng biển Quảng Ninh, Hải Phòng, Nam Định, Khánh Hòa được sử dụng để gây nhiễm trên cá mú có kích thước 1,5cm. Theo dõi tỷ lệ cá chết có biểu hiện lâm sàng của bệnh hoại tử thần kinh ở các lô thí nghiệm trong 15 ngày đồng thời xác định gen mã hóa kháng nguyên của NNV để khẳng định sự có mặt của virut trong các mẫu cá chết. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2: Kết quả gây nhiễm NNV trên cá mú con

STT	Ký hiệu mẫu (n=30)	Tỷ lệ chết cộng dồn sau 15 ngày (%) theo các độ pha loãng virus									LD ₅₀	Gen T2								
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
1	QN 02	100	100	100	100	80	60	53,3	13,3	13,3	10 ^{-6,2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	QN 05	100	100	100	93,3	93,3	80	66,7	53,3	33,3	10 ^{-7,5}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	QN 07	100	100	100	80	80	73,3	60	46,7	40	10 ^{-7,5}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	NĐ 01	100	100	100	93,3	66,7	53,3	30	26,6	13,3	10 ^{-5,5}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	NĐ 11	100	100	100	86,7	86,7	66,7	53,3	30	15	10 ^{-6,5}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	KH 05	100	100	100	73,3	66,7	53,3	53,3	13,3	13,3	10 ^{-6,2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	KH 09	80	80	53,3	26,6	13,3	6,7	6,7	0	0	10 ^{-2,6}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	HP 11	66,7	53,3	30	13,3	6,7	6,7	6,7	0	0	10 ^{-1,5}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	ĐC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: nd: không tính toán, gen T2: gen mã hóa kháng nguyên của NNV [4] +: dương tính với gen T2, -: âm tính với gen T2,
ĐC: tiêm Leibovitz's L-15

8 chủng NNV tiếp tục được gây nhiễm cho cá mú con với liều LD₅₀ để đánh giá độc lực của virus thông qua mức độ gây chết cá tại các thời điểm theo dõi thí nghiệm. Các mẫu cá chết có biểu hiện của bệnh hoại tử thần kinh được giám định đồng thời gen T2.

Bảng 3. Kết quả gây nhiễm cá mú con với các chủng NNV đã phân lập

Bố trí lô thí nghiệm (n=30)	LD ₅₀	Tỷ lệ chết tích lũy (%) theo thời gian gây nhiễm (h)					Gen T2
		24	36	72	96	120	
QN 02	10 ^{-6,2}	13,3	46,7	100			+
QN 05	10 ^{-7,5}	23,3	63,3	100			+
QN 07	10 ^{-7,5}	26,7	50	100			+
NĐ 01	10 ^{-5,5}	16,7	23,3	40	56,7	73,3	+
NĐ 11	10 ^{-6,5}	23,3	43,3	63,3	83,3	100	+
KH 05	10 ^{-6,2}	30	36,7	100			+
KH 09	10 ^{-2,6}	10	16,7	33	40	75	+
HP 11	10 ^{-1,5}	3,3	13,3	30	46,7	72	+
Đối chứng âm (n=15)	nd	0	0	0	6,67	6,67	-

Kết quả trình bày trong bảng 3 cho thấy, ở lô đối chứng âm, 1 cá bị chết khi được tiêm Leibovits L15 10%, tỷ lệ chết cộng dồn sau 120 giờ là 6,67%, kiểm tra gen T2 cho kết quả âm tính.

Có 4/8 chủng gây chết 100% cá ở thời điểm 72 giờ là các chủng QN 02, QN 05, QN 07 và KH 05, 1 chủng gây chết 100% cá ở thời điểm 120 giờ là NĐ 11, 3 chủng gây chỉ gây chết 72-75% cá ở thời điểm 120 giờ là các chủng NĐ 01, KH 09, HP 11. Như vậy, 4 chủng ký hiệu QN 02, QN 05 QN 07 và KH 05 có độc lực mạnh hơn các chủng còn lại, các chủng này được sử dụng trong phản ứng trung hòa để kiểm tra kháng thể ở động vật thí nghiệm được tiêm NNV.

3.2. Nghiên cứu khả năng gây đáp ứng miễn dịch của NNV

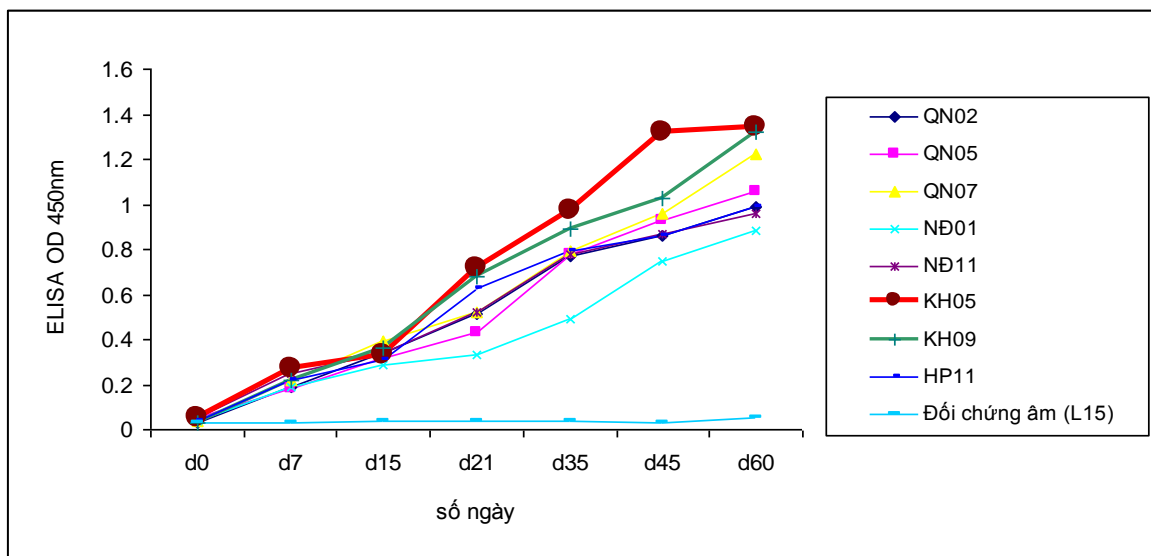
3.2.1. Kết quả nghiên cứu khả năng gây đáp ứng miễn dịch của NNV trên thỏ

8 chủng NNV phân lập được trên cá mú ở các tỉnh Quảng Ninh, Hải Phòng, Nam Định và Khánh Hòa được sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ nhằm 2 mục đích: i) lựa chọn được chủng đại diện kháng nguyên, ii) đánh giá khả năng trung hòa virus cường độc của kháng thể thu được.

3.2.1.1. Kết quả lựa chọn chủng NNV đại diện kháng nguyên

Chủng đại diện kháng nguyên là chủng phải đạt ít nhất 2 tiêu chí: i) có khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch nhanh, mạnh nhất, ii) kháng thể sinh ra bởi chủng này phải nhận biết được nhiều chủng virus NNV khác nhau.

Để lựa chọn được chủng này, chúng tôi đã tiêm NNV vào thỏ thí nghiệm với 2 lần nhắc lại ở các ngày thứ 7 và 15. Theo dõi biến động hiệu giá kháng thể trên thỏ bằng phản ứng ELISA. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong đồ thị 1.



Đồ thị 1. Biến động kháng thể trong máu thỏ được tiêm NNV (ELISA OD₄₅₀)

Kết quả trong đồ thị cho thấy chủng KH 05, KH 09, QN 07 có khả năng gây đáp ứng miễn dịch nhanh và mạnh hơn cả trên thỏ thí nghiệm, các chủng còn lại gây đáp ứng chậm và kém hơn. Do đó, kháng thể của 3 chủng KH 05, KH 09, QN 07 được lựa chọn để kiểm tra khả năng nhận biết chéo với các chủng virus gây bệnh hoại tử thần kinh khác nhau nhằm tìm ra mẫu kháng thể nhận biết nhiều chủng NNV nhất. Thí nghiệm này được thực hiện bởi phản ứng ELISA trực tiếp. Kết quả trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả kiểm tra khả năng phát hiện chéo các chủng NNV của kháng thể đặc hiệu với 3 chủng KH 05, KH 09, QN 07 (ELISA OD₄₅₀=1,2)

Kháng thể / Chủng virus	KH 05	KH 09	QN 07
KH 05	+	+	-
KH 09	+	+	-
QN 07	+	+	+
QN 02	+	+	+
QN 05	+	+	+
NĐ 01	+	+	+
NĐ 11	+	+	+
HP 11	+	+	+

Kết quả phản ứng ELISA trực tiếp cho thấy, kháng thể đặc hiệu với hai chủng KH 05 và KH 09 có khả năng gây phản ứng chéo với 7 chủng còn lại, trong khi đó kháng thể của chủng QN 07 lại không phát hiện được 2 chủng NNV phân lập được tại Khánh Hòa. Có thể chủng QN 07 thuộc phân typ khác của NNV.

Từ kết quả ở bảng 2 và biểu đồ 1, chủng KH 05 được chúng tôi lựa chọn làm chủng đại diện kháng nguyên vì chủng này đạt được 2 tiêu chí: có khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch nhanh, mạnh nhất và kháng thể sinh ra bởi KH 05 nhận biết được nhiều chủng virus NNV khác nhau.

NNV KH 05 được bất hoạt bởi formalin ở các nồng độ: 0,1%; 0,3% và 0,5%. Sau 5 ngày bất hoạt và trung hòa bởi sodium phosphate, virus được tiêm

truyền trở lại trên cá mú để đánh giá mức độ bất hoạt. Kết quả thí nghiệm thu được trình bày trong bảng 5:.

Bảng 5. Kết quả đánh giá mức độ bất hoạt của NNV ở các nồng độ formalin

Nồng độ Formalin (%)	Số con/lô	Liều tiêm	Biểu hiện cá tiêm truyền virus sau khi xử lý bằng formalin	Gen T2
0,1%	15	0,1ml/con	Bơi không định hướng trong 3 ngày đầu, sau đó bơi đứng, bỏ ăn; 100% lô cá bị chết sau 7 ngày	+
0,3%	15	0,1ml/con	Cá bình thường, không có biểu hiện đặc biệt	-
0,5%	15	0,1ml/con	Cá bình thường, không có biểu hiện đặc biệt	-

Kết quả thí nghiệm cho thấy, 100% cá chết sau 7 ngày tiêm truyền dịch virus được xử lý formalin 0,1%, cho kết quả dương tính với gen T2. Như vậy, nồng độ formalin 0,1% không gây bất hoạt hoàn toàn đối với chủng NNV KH 05.

Ở hai lô virus được xử lý formalin 0,3% và 0,5% chúng tôi không phát hiện cá chết cũng như các triệu chứng của bệnh hoại tử thận kinh. Bằng phản ứng RT-PCR, đoạn gen T2 cũng không được phát hiện trên cá gây nhiễm. Như vậy hai nồng độ này đã bất hoạt hoàn toàn chủng NNV KH 05.

Từ kết quả trên cho phép chúng tôi xác định rằng, nồng độ formalin 0,3% thích hợp để bất hoạt virus, phục vụ gây miễn dịch cho cá thí nghiệm.

3.2.1.2. Kết quả đánh giá khả năng trung hòa NNV cường độc của kháng thể thu được trên thỏ

Phản ứng trung hòa được thực hiện với 3 chủng virus cường độc ký hiệu là QN 02, QN 05 và QN 07 và kháng thể thu được từ thỏ gây miễn dịch với chủng KH 05. Định kỳ thu huyết thanh của thỏ để làm phản ứng trung hòa với 03 chủng virus NNV cường độc. Các mẫu kháng thể và virus được ủ trong 6 giờ, 37⁰C rồi tiêm trở lại cá mú sạch bệnh. Theo dõi cá trong 3 ngày, kết quả trung hòa virus được đánh giá bằng tỷ lệ các nhiễm bệnh và chết được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6. Kết quả trung hòa các chủng NNV cường độc của kháng thể kháng NNV KH 05

Tên chủng	Tỷ lệ cá mắc bệnh/ chết (%)	Ngày thu huyết thanh						
		d0	d7	d15	d21	d35	d45	d60
QN 02 (n=20)	Tỷ lệ cá mắc bệnh (%)	100	100	20	5	0	0	0
	Tỷ lệ cá chết (%)	100	100	0	0	0	0	0
QN 05 (n=20)	Tỷ lệ cá mắc bệnh (%)	100	100	25	10	0	0	0
	Tỷ lệ cá chết (%)	100	75	0	0	0	0	0
QN 07 (n=20)	Tỷ lệ cá mắc bệnh (%)	100	100	35	5	0	0	0
	Tỷ lệ cá chết (%)	100	90	5	0	0	0	0

Ghi chú: d: ngày thu huyết thanh thỏ

Số liệu trong bảng 6 cho thấy, kháng thể trung hòa ở thỏ được sinh ra từ ngày thứ 35 sau khi gây miễn dịch bằng NNV, 100% cá được tiêm dịch virus trung hòa không bị chết với triệu chứng của bệnh hoại tử thần kinh, cũng như không bị nhiễm NNV (giám định bằng sự có mặt của gen T2 trong mô não cá và quan sát triệu chứng lâm sàng). Ở ngày thứ 15, tỷ lệ cá chết và mắc bệnh có sự sai khác ở 03 chủng thí nghiệm, chênh lệch giữa tỷ lệ cá mắc bệnh và chết từ 20-30% .

3.2.2. Đánh giá khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của NNV trên cá mú

Chủng NNV KH 05 bất hoạt được nhũ hóa bằng dầu Montanide ISA70 rồi gây đáp ứng miễn dịch cho cá mú 3 lần ở các ngày thứ 1, 7, 10 với liều 0,1 ml/con (hiệu giá virus là $10^{-6,2}$), lô đối chứng tiêm L15 10%. Sau khi gây miễn dịch, cá mú được công cường độc bởi các chủng QN 02, QN 05, QN 07 để đánh giá khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của cá với NNV. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 7:

Bảng 7: Kết quả tạo đáp ứng miễn dịch của NNV trên cá mú

Tên chủng	Tỷ lệ cá mắc bệnh/ chết (%)	Ngày công cường độc (n=20)						
		d15	d20	d25	D30	d35	d40	d45
QN 02	Tỷ lệ cá mắc bệnh (%)	30	25	25	20	20	15	15
	Tỷ lệ cá chết (%)	15	10	15	15	10	10	10
QN 05	Tỷ lệ cá mắc bệnh (%)	35	25	20	15	15	15	15
	Tỷ lệ cá chết (%)	25	15	10	10	10	10	10
QN 07	Tỷ lệ cá mắc bệnh (%)	30	20	20	15	15	15	15
	Tỷ lệ cá chết (%)	25	15	20	15	15	10	10

Theo số liệu trong bảng 7, NNV bất hoạt đã tạo ra kháng thể trong cá thí nghiệm. Ở ngày thứ 15, kháng thể sinh ra bảo hộ được 65-70% cá bị công cường độc. Từ ngày thứ 20-30 kháng thể sinh ra bảo hộ được 80-85% cá bị công cường độc. Lô đối chứng tiêm virus bất hoạt nhưng không công cường độc đã không phát hiện thấy gen T2 có trong não cá (số liệu không thể hiện trong bảng 7), chứng tỏ cá bị bệnh ở các lô thí nghiệm là do các chủng công cường độc QN 02, QN 05, QN 07. Kết quả này chỉ ra rằng có thể sản xuất được vacxin phòng bệnh hoại tử thần kinh cho tỷ lệ bảo hộ cao hơn nếu như lựa chọn liều kháng nguyên và số lần tiêm nhắc lại phù hợp.

IV. Kết luận và đề nghị

- Đã xác định được liều $TCID_{50}$ LD_{50} của 8 chủng virus gây bệnh hoại tử thần kinh trên cá mú, mức độ gây nhiễm của các chủng khác nhau, trong đó có 4 chủng có độc lực mạnh hơn cả là QN 02, QN 05, QN 07 và KH 05.

- Đã lựa chọn được chủng đại diện kháng nguyên là KH 05. Chủng virus này bị bất hoạt bởi formalin 0,3%.

- NNV KH 05 bất hoạt tạo kháng thể trung hòa với NNV công cường độc ở ngày thứ 15 trên thỏ và kháng thể bảo hộ trên cá là 80- 85% ở ngày thứ 20 sau khi gây miễn dịch.

Đề nghị nghiên cứu lặp lại để có cơ sở vững chắc cho SX vaccin. Đề nghị nghiên cứu sản xuất vaccin vô hoạt nhũ dầu để phòng bệnh hoại tử thần kinh ở cá mú.

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. Liu W, Hsu CH, Chang CY, Chen HH, Lin CS. (2006). Immune response against grouper nervous necrosis virus by vaccination of virus-like particles. *Vaccine* 24(37-39):6282-7
4. Renault, T., Haffner, P., Baudin, L.F., Breuil, G., Bonami, J.R., 1991. Mass mortalities in hatchery-reared sea bass *Lates calcarifer* larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 11, 68–73.