

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG BẢO HỘ CỦA VACCIN VÔ HOẠT CARÊ CHẾ TỪ CHỦNG CDV-VNUA-768 TRÊN CHÓ THÍ NGHIỆM

Trần Văn Nền*, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Hữu Nam

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email: tvnen@vnua.edu.vn/bstytvnen@gmail.com*

Ngày gửi bài: 03.11.2015

Ngày chấp nhận: 14.01.2016

TÓM TẮT

Vaccin vô hoạt carê được chế từ chủng CDV-VNUA-768 đã được đánh giá khả năng bảo hộ trên 6 chó bằng công cường độc với chủng CDV-HUA-04H. 6 chó Beagle cái 6 tuần tuổi được tiêm vaccin vô hoạt carê chế từ chủng CDV-VNUA-768, sau đó 3 tuần được công cường độc bằng chủng virus CDV-HUA-04H. Đáp ứng miễn dịch kháng thể của chó thí nghiệm sau khi tiêm vaccin vô hoạt carê gây ra được khảo sát bằng phản ứng ELISA phát hiện kháng thể. Hiệu giá kháng thể đạt ngưỡng trên giá trị tới hạn sau 21 ngày tiêm vaccin, sau đó đạt cực đại sau 35-42 ngày tiêm (với hiệu giá trung bình đạt 1,54). Ở các ngày 42 tới 49 ngày sau khi tiêm, hiệu giá kháng thể giảm dần nhưng vẫn đạt trên ngưỡng giá trị tới hạn ở 49 ngày với giá trị hiệu giá trung bình đạt 1,35. Sau 21 ngày tiêm vaccin lần hai, các chó thí nghiệm và đối chứng được công cường độc với chủng CDV-HUA-04H. Kết quả theo dõi hiệu giá kháng thể đã chỉ ra ở lô tiêm vaccin đã tạo ra kháng thể đặc hiệu với virus carê với giá trị hiệu giá trung bình đạt 0,69 lớn hơn giá trị tới hạn. Kết quả nghiên cứu này cho thấy chó được tiêm vaccin vô hoạt carê chế từ chủng CDV-HUA-768 được bảo hộ 100%.

Từ khóa: CDV, khả năng bảo hộ, vaccin vô hoạt.

Laboratory Evaluation of Efficacy of Inactivated Vaccine Using The Canine Distemper CDV-VNUA-768 Strain

ABSTRACT

Canine distemper inactivated vaccines produced from CDV-VNUA-768 strain virus were evaluated for their protected capacity dogs by inoculating with CDV-HUA-04H strain virus. Six female Beagle dogs (six weeks old) were injected with the vaccine produced from CDV-VNUA-768 strain virus and inoculating with CDV-HUA-04H strain virus after 3 week post injection. Antibody response in dogs after vaccination against Canine distemper virus was examined by ELISA. Antibody contents reached above critical level after 21 days of vaccination and maximum value during 35- 42th day (titer mean of antibody was 1.54) after vaccination. Between from 42th day to 49th day after vaccination, antibody contents decreased but maintained above the critical level at 49th day (titer mean of 1.35). After 21 day post inoculation with CDV-HUA-04H strain virus, the vaccine groups produced specific antibody for canine distemper virus with titer mean above critical level (0.69). Result of this study showed that dogs were protected with 100 percent when they were injected with inactivated vaccine produced from CDV-VNUA-768.

Keywords: CDV, inactivated vaccine, protected capacity.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh carê được báo cáo lần đầu tiên ở châu Âu vào năm 1760 (Appel and Gillespie, 1972). Nguyên nhân gây bệnh carê trên chó là do Canine distemper virus (CDV). CDV là một

thành viên của giống Morbillivirus, thuộc họ Paramixoviridae. Các thành viên khác của giống Morbillivirus như virus gây bệnh sởi trên người (Morbillivirus - MV), virus dịch tả trâu bò (Rinderpest virus - RPV), virus gây bệnh trên động vật nhai lại nhỏ (Peste-des-petits-ruminants

virus - PPRV), virus gây bệnh trên động vật có vú dưới nước (cá heo, hải cẩu) (Murphy et al., 1999). Virus carê cũng gây bệnh trên động vật hoang dã ăn thịt và hổ (Appel et al., 1994; Frolich et al., 2000). Virus carê có cấu tạo gồm một sợi RNA đơn không phân đoạn gồm khoảng 15.690 nucleotide. Trong cấu trúc bộ gen gồm 6 gen mã hóa cho một protein tạo lớp vỏ bọc (M), hai glycoprotein (yếu tố kết dính (H), yếu tố dung hợp (F)), hai protein có liên quan tới khả năng phiên mã (phosphoprotein - P và large protein - L) và nucleocapsid N là vỏ bọc bên ngoài RNA của virus (Sidhu et al., 1993). CDV là virus gây nhiễm hướng lympho, niêm mạc và mô thần kinh. Bệnh thường xảy ra ở chó non, lây lan nhanh, tỷ lệ chết rất cao với các triệu chứng như: sốt, viêm cata ở niêm mạc, đặc biệt là niêm mạc đường hô hấp, viêm phổi, nổi mụn ở da và những triệu chứng thần kinh. Bệnh carê xảy ra khắp nơi trên thế giới, bệnh phổ biến ở một số nước như Mỹ, Argentina, Brasil, Mexico, Nam Phi và nhiều nước ở Châu Âu, gần đây nhất là ở các nước châu Á như Nhật Bản (Lan et al., 2006), Thái Lan (Keawcharoen et al., 2005), Hàn Quốc (An et al., 2008) và Ấn Độ (Latha et al., 2007). Tỷ lệ chết do mắc carê khác nhau giữa các loài và dao động từ 0% ở mèo nhà tới 100% ở chồn sương. Đối với chó nhà, tỷ lệ chết khoảng 50%, mặc dù một số ổ dịch ở châu Phi thì tỷ lệ chết trên chó hoang lên đến 95%.

Virus carê có thể dùng để sản xuất vaccin sống do tạo ra được đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch kéo dài suốt đời cho con vật. Năm 1950, vaccin nhược độc carê đã được sử dụng để ngăn chặn và giảm tỷ lệ mắc carê ở các động vật mẫn cảm. Vaccin carê phổ biến hiện nay đang được sử dụng được chế từ chủng Onderstepoort nhược độc (CDV^{OP}), được tạo ra bằng cách cấy chuyển 57 đời trên chồn sương, 208 đời qua phôi gà, 62-66 đời trên môi trường tế bào phôi gà, 13-14 đời trên môi trường tế bào thận chồn sương, trên 100 đời trên môi trường tế bào Vero (Bussell and Karzon, 1965). Tuy nhiên, do xuất hiện nhiều đột biến gen ở nhiều gen khác nhau của virus carê đã làm cho hiệu quả phòng bệnh của vaccin giảm sút và có thể gây nguy hiểm cho các loài động vật khác. Điều này đã dẫn đến

một vài đợt dịch bệnh bùng phát trên chó đã được tiêm phòng vaccin những vẫn mắc bệnh carê với triệu chứng điển hình của bệnh carê (Blixenkronne-Møller et al., 1993). Vì vậy, vấn đề quan trọng hiện nay là việc nâng cao hiệu quả vaccin hiện có. Ở nước ta, bệnh carê được phát hiện từ năm 1920 nhưng đến nay bệnh đã xảy ra ở hầu hết các tỉnh và gây thiệt hại lớn do tỷ lệ tử vong của bệnh rất cao nhưng việc nghiên cứu sản xuất vaccin trong nước từ chính các chủng virus carê gây bệnh vẫn chưa được nghiên cứu nhiều. Trong khi đó, nguồn vaccin phòng bệnh carê hiện nay chủ yếu được nhập ngoại từ nước ngoài. Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sản xuất vaccin vô hoạt carê trong quy mô phòng thí nghiệm để phòng bệnh do virus carê gây ra. Đối với vaccin thì khả năng bảo hộ được coi là một trong những yếu tố chất lượng cần thiết đối với vaccin vô hoạt nói chung và vaccin vô hoạt carê nói riêng. Do đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu “Đánh giá khả năng bảo hộ của vaccin vô hoạt carê chế từ chủng CDV-VNUA-768 trên chó thí nghiệm”.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

- Vaccin vô hoạt carê được nghiên cứu sản xuất tại Phòng thí nghiệm trọng điểm CNSH, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Thành phần chính của vaccin vô hoạt carê gồm chủng virus CDV-VNUA-768 (hiệu giá virus là $3,16 \times 10^4$ TCID₅₀), được vô hoạt bằng formalin 35% sau đó được trộn với Al(OH)₃ 10% theo tỷ lệ 1:1.

- Động vật thí nghiệm: 6 chó Beagle cái 6 tuần tuổi (khối lượng 4-5 kg) khỏe mạnh được nuôi tại trung tâm nghiên cứu chó nghiệp vụ của Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam trong điều kiện an toàn sinh học cấp II. Các chó thí nghiệm đều không có kháng thể kháng virus carê và không mắc các bệnh do virus khác.

- Tế bào Vero-DST-cell expressing the receptor protein for CDV (tế bào Vero mang receptor nhận biết virus Carê) được nuôi cấy trên khay nuôi cấy tế bào hoặc đĩa lồng. Môi trường tế bào được sử dụng là môi trường DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle Medium) có chứa 5% FCS (Fetal calf serum).

- Mẫu máu được lấy định kỳ hàng tuần từ lô chó thí nghiệm ở thời điểm trước, sau khi tiêm vaccin vô hoạt carê và công cường độc cho tới khi kết thúc nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Tiêm vaccin: Các chó ở lô thí nghiệm được tiêm vaccin với liều 2 ml vào dưới da cổ bên trái, sau 28 ngày tiêm lặp lại lần 2 với liều 2 ml dưới da cổ bên phải.

- Phương pháp ELISA được thực hiện bằng bộ kit ELISA nhằm phát hiện kháng thể trong huyết thanh. Các bước tiến hành được thực hiện theo protocol của nhà sản xuất. Kết quả phản ứng ELISA được đọc ở bước sóng 450nm. Mẫu âm tính khi giá trị OD \leq giá trị Cut off. Mẫu dương tính khi giá trị OD $>$ giá trị Cut off. Giá trị Cut off = giá trị OD của đối chứng dương x 0,2.

- Phương pháp công cường độc: Chủng CDV-HUA-04H được bảo quản tại phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ sinh học khoa Thú y, có hiệu giá virus là $6,25 \times 10^5$ TCID₅₀. 1 ml chủng CDV-HUA-04H có liều 100 LD₅₀ được tiêm tĩnh mạch chó sau 21 ngày tiêm vaccin lần 2. Triệu chứng lâm sàng của các chó được theo dõi hàng ngày và ghi lại nhiệt độ cơ thể và khối lượng cơ thể sau 21 ngày công cường độc. Mẫu máu và dịch swab được lấy ở các ngày thứ 4, 7, 10, 14, 21 ở tất cả chó thí nghiệm và đối chứng sau khi công cường độc để kiểm tra huyết thanh học và phân lập virus.

- Phân lập virus CDV:

Bước 1, chuẩn bị tế bào phân lập: Tế bào Vero-DST được đưa vào nuôi cấy trong môi trường và điều kiện thích hợp, môi trường DMEM có bổ sung 5% FCS làm ấm trong tủ 37°C trong 30 phút trước khi gây nhiễm virus.

Bước 2, chuẩn bị mẫu phân lập: Mẫu bệnh phẩm được nghiền bằng chày và cối vô trùng sau đó được đồng nhất trong dung dịch MEM. Ly tâm tốc độ cao thu được hỗn dịch, hỗn dịch đồng nhất qua lọc được lấy để gây nhiễm vào tế bào Vero-DST.

Bước 3, gây nhiễm virus và quan sát kết quả: Từ các đĩa lồng tế bào đã chuẩn bị ở bước 1, hút bỏ môi trường nuôi cấy và bổ sung 100 μ l mẫu đã chuẩn bị ở bước 2. Tế bào gây nhiễm virus được ủ ở 37°C với 5% CO₂ trong 30 phút. Bổ sung 1,5 ml môi trường DMEM có chứa 10% TPB (Tryptose Phosphate Broth) vào đĩa lồng và để ở 37°C với 5% CO₂. Hàng ngày theo dõi sự phá hủy tế bào bằng kính hiển vi soi nổi và thu virus khi tế bào bị phá hủy đạt 80-90% diện tích đáy của đĩa lồng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hàm lượng kháng thể ở chó thí nghiệm trước khi tiêm vaccin carê vô hoạt

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng đáp ứng miễn dịch trên chó được tiêm vaccin carê vô hoạt chế từ chủng CDV-VNUA-768. 6 chó Beagle cái 6 tuần tuổi được chia làm 2 lô thí nghiệm, 1 lô được tiêm phòng với vaccin carê vô hoạt, 1 lô được dùng làm đối chứng. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể của 6 chó thí nghiệm trước khi tiêm vaccin bằng phương pháp ELISA được trình bày ở cột 0 ngày trong bảng 1.

Qua bảng 1, 6 chó được lựa chọn thí nghiệm đều không có kháng thể kháng virus carê và các chó này đều chưa được tiêm phòng vaccin carê hay có kháng thể từ mẹ. Kháng thể có nguồn gốc từ mẹ được coi là nguyên nhân đầu tiên có thể tác động tiêu cực tới sự hình thành đáp ứng miễn dịch ở chó con (Wilson et al., 2014). Do đó, các chó trong nghiên cứu này đảm bảo các điều kiện tối ưu để tiến hành khảo sát đáp ứng miễn dịch ở chó khi tiêm vaccin carê vô hoạt.

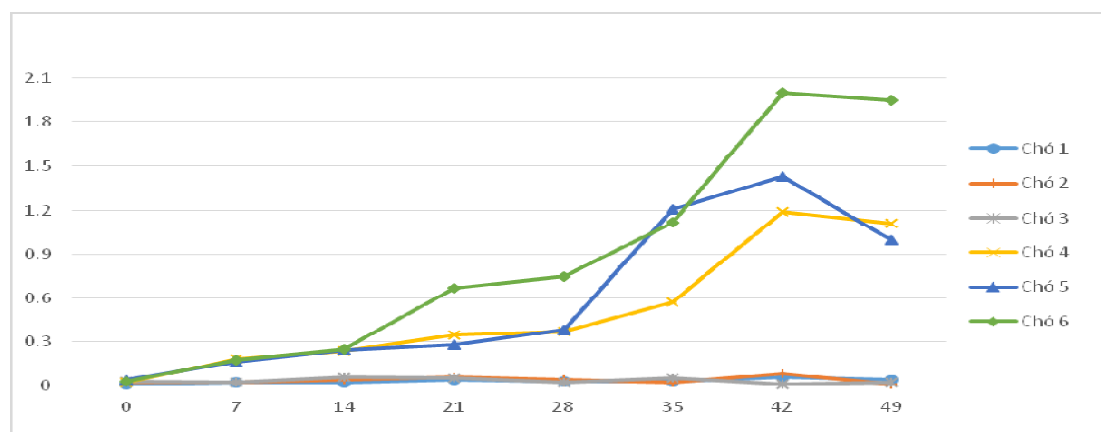
3.2. Hàm lượng kháng thể ở chó thí nghiệm sau khi tiêm phòng vaccin lặp lại

Sau khi kiểm tra hiệu giá kháng thể với virus carê ở 6 chó thí nghiệm, tiến hành tiêm phòng vaccin vô hoạt carê được chế từ chủng CDV-VNUA-768 cho lô chó thí nghiệm với liều 2 ml vào dưới da cổ bên trái. Sau 28 ngày tiêm lặp lại lần 2 với liều 2 ml dưới da cổ bên phải. Ở lô đối chứng sử dụng nước cất để tiêm cho chó thí nghiệm. Sau khi tiêm vaccin, các chó được lấy máu hàng tuần để kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus carê bằng phương pháp ELISA.

Bảng 3.1. Hiệu giá kháng thể của 6 chó thí nghiệm sau khi tiêm vaccin bằng ELISA

Ngày sau tiêm		0	7	14	21	28	35	42	49
		Giá trị OD	Giá trị OD	Giá trị OD	Giá trị OD	Giá trị OD	Giá trị OD	Giá trị OD	Giá trị OD
Giá trị Cut off = 0,3									
Lô đối chứng	Chó 1	0,010	0,020	0,020	0,040	0,030	0,030	0,060	0,040
	Chó 2	0,020	0,020	0,040	0,060	0,040	0,020	0,080	0,010
	Chó 3	0,030	0,020	0,060	0,050	0,020	0,050	0,010	0,020
Lô tiêm vaccin	Chó 4	0,020	0,183	0,240	0,344	0,366	0,570	1,188	1,113
	Chó 5	0,040	0,167	0,244	0,279	0,383	1,206	1,430	1,000
	Chó 6	0,030	0,179	0,250	0,669	0,746	1,115	1,998	1,949

Ghi chú: OD (Optical Density): mật độ quang học; Cut off: giá trị tới hạn



Biểu đồ 1. Biến động dương tính huyết thanh học ở chó được tiêm vaccin carê so với đối chứng không tiêm vaccin

Qua kết quả ở bảng 1 và biểu đồ 1 cho thấy các lô đối chứng đều không có kháng thể với virus carê với các giá trị OD nhỏ hơn giá trị Cut off (0,3). Trong quá trình thí nghiệm, ở các lô đối chứng đều không xuất hiện kháng thể với virus carê nên khẳng định môi trường chăm sóc, chăn nuôi các lô động vật thí nghiệm không có sự xuất hiện của virus carê. Kết quả phân tích chỉ ra rằng: sau khi tiêm vaccin vô hoạt CDV được chế từ chủng CDV-VNUA-768 ở lô thí nghiệm có hiệu giá kháng thể với giá trị OD lớn hơn giá trị tới hạn (Cut off = 0,3).

Ở lô chó tiêm vaccin vô hoạt CDV thì hiệu giá kháng thể tăng dần sau khi tiêm vaccin lần 1 và lần 2 từ 0 tới 35 ngày, sau đó giảm dần sau 42 ngày tới 49 ngày theo dõi. Hiệu giá kháng thể với giá trị OD lớn hơn giá

trị tới hạn (Cut off) sau 21 ngày tiêm, sau đó đạt cực đại trong giai đoạn 35-42 ngày tiêm ($OD_{tb} = 1,54 > 0,3$). Ở các ngày 42 tới 49 ngày sau khi tiêm, hiệu giá kháng thể giảm dần và vẫn đạt trên ngưỡng giá trị tới hạn (Cut off) ở 49 ngày ($OD_{tb} = 1,35 > 0,3$). Hiệu giá kháng thể sau khi tiêm vaccin lặp lại lần 2 cao hơn so với sau khi tiêm vaccin lần 1, điều này có thể được giải thích do có đáp ứng trí nhớ miễn dịch nên có hiệu giá kháng thể và có tỷ lệ bảo hộ cao hơn nhiều. Đồng thời, ở những chó thí nghiệm này không thấy có nguồn kháng thể thụ động từ mẹ nên lượng kháng thể được tạo ra ở lô thí nghiệm là kháng thể chủ động. Kết quả nghiên cứu phù hợp với kết quả nghiên cứu của tác giả Norrby et al. (1986), Wilson et al. (2014).

3.3. Hàm lượng kháng thể ở chó thí nghiệm sau khi công cường độc

Nhằm đánh giá khả năng tạo kháng thể bảo hộ của vaccin vô hoạt carê được chế từ chủng CDV-VNUA-768, chúng tôi đã theo dõi hiệu giá kháng thể của 2 lô chó thí nghiệm sau khi công cường độc với chủng CDV-HUA-04H (hiệu giá virus $6,25 \times 10^5$ TCID₅₀/25 μ l) trong thời gian 21 ngày sau khi gây nhiễm. Kết quả được trình bày ở bảng 2 và biểu đồ 2.

Từ kết quả ở bảng 2 và biểu đồ 2 cho thấy, ở các lô đối chứng sau khi công cường độc với chủng CDV-HUA-04H, giá trị OD tăng dần từ 7 ngày tới 21 ngày sau gây nhiễm, tại 21 ngày sau gây nhiễm giá trị OD_{tb} đạt 0,27 nhỏ hơn giá trị tới hạn (Cut off = 0,3). Trong khi đó, ở lô tiêm vaccin thì trong khoảng thời gian 7-21

ngày sau khi gây nhiễm, biểu đồ biểu diễn có chiều hướng đi xuống nhưng giá trị OD_{tb} tại ngày 21 sau khi gây nhiễm đạt 0,56 lớn hơn giá trị tới hạn (Cut off = 0,3). Như vậy, hiệu giá kháng thể ở lô tiêm vaccin sau khi công cường độc 21 ngày thì hàm lượng kháng thể vẫn trên ngưỡng giá trị tới hạn, điều này giúp cho con vật có khả năng bảo hộ khi công cường độc với chủng virus CDV-HUA-04H.

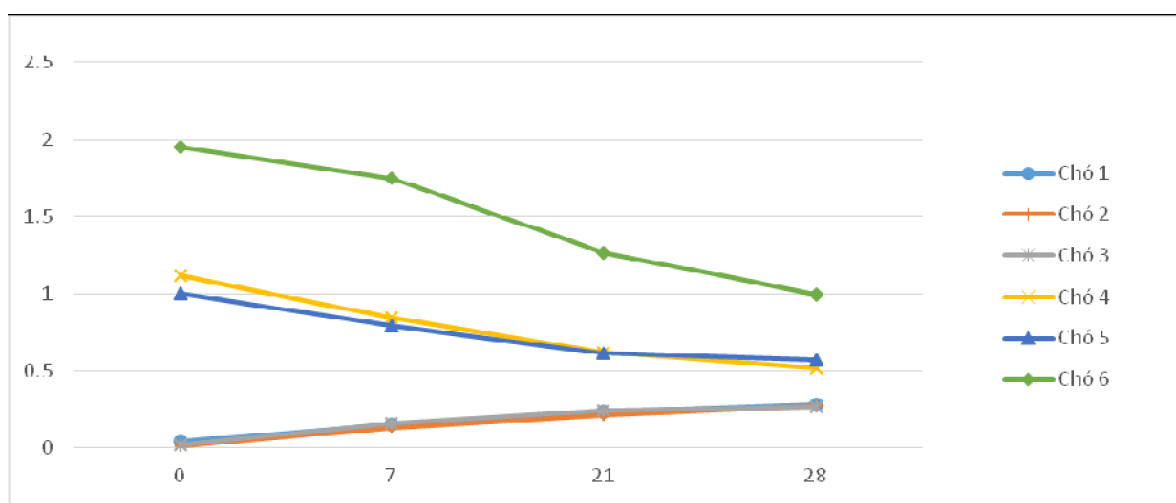
3.4. Triệu chứng lâm sàng của các chó thí nghiệm sau khi công cường độc

Sau khi công cường độc với chủng CDV-HUA-04H, các biểu hiện lâm sàng trên 6 chó thí nghiệm được quan sát hàng ngày gồm các chỉ tiêu như thân nhiệt (đo tại trực tràng), tiêu chảy, giảm cân được trình bày ở bảng 3.

Bảng 2. Hiệu giá kháng thể của chó thí nghiệm sau khi công cường độc

Ngày sau gây nhiễm		0	7	14	21
		Giá trị OD	Giá trị OD	Giá trị OD	Giá trị OD
		Giá trị Cut off = 0,3			
Lô đối chứng	Chó 1	0,040	0,150	0,230	0,280
	Chó 2	0,010	0,130	0,210	0,270
	Chó 3	0,020	0,160	0,240	0,260
Lô tiêm vaccin	Chó 4	1,113	0,848	0,624	0,514
	Chó 5	1,000	0,791	0,613	0,568
	Chó 6	1,949	1,748	1,267	0,995

Ghi chú: OD (Optical Density): mật độ quang học; Cut off: giá trị tới hạn



Biểu đồ 2. So sánh giá trị OD giữa hai lô chó thí nghiệm sau khi công cường độc

Bảng 3. Các triệu chứng lâm sàng của các chó thí nghiệm sau khi công cường độ

Lô thí nghiệm	Chó	Tiêu chảy ^a	Giảm cân ^b	Theo dõi thân nhiệt ở chó theo ngày ^c																				
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Đối chứng	1	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-		
	2	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	3	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-		
Tiêm vaccin	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Chú thích: a: +: tiêu chảy, -: không tiêu chảy

b: +: giảm cân, -: không giảm cân

c: +: nhiệt độ $\geq 39,5^{\circ}C$, -: nhiệt độ bình thường trong khoảng $37,0-39,5^{\circ}C$

Trong quá trình theo dõi các biểu hiện ở 6 chó trong 2 lô thí nghiệm và lô đối chứng thì ở lô đối chứng cả 3 chó đều xuất hiện hiện tượng tiêu chảy sau 2 tuần gây nhiễm. Chó 1 và 3 có dấu hiệu giảm cân trong giai đoạn 4-14 ngày theo dõi và có dấu hiệu xuất hiện hai giai đoạn cơn sốt ở các ngày 4-5 và ngày 12-13 trong khi ở chó 2 chỉ xuất hiện một giai đoạn sốt ở ngày thứ 4 sau khi gây nhiễm. Ở lô đối chứng cả 3 chó đều chết sau 21 ngày gây nhiễm. Riêng cả 3 chó ở lô tiêm vaccin thì không quan sát thấy hiện tượng gì sau khi gây nhiễm với virus Ca rê. Kết quả này của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Norrby et al. (1986). Sự sai khác này giữa hai lô thí nghiệm khẳng định ở lô chó được tiêm vaccin đã tạo ra được kháng thể chủ động đặc hiệu với virus carê nên khi gây nhiễm với chủng virus carê thì kháng thể này đã trung hòa virus nên không gây nên các triệu chứng điển hình của bệnh như sốt cao, tiêu chảy, giảm cân như ở lô đối chứng.

3.5. Kết quả phân lập virus ở các chó thí nghiệm sau khi công cường độ

Nhằm khẳng định kết quả công cường độ virus carê trên lô chó thí nghiệm, mẫu dịch swab của lô chó đối chứng và lô chó thí nghiệm được lấy ở các ngày 4, 7, 10, 14, 21 sau khi gây nhiễm được dùng để phân lập virus carê. Kết quả phân lập virus carê được trình bày ở bảng 4.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy kết quả phân lập virus ở các chó đối chứng đều dương tính với CDV trong thời gian tiến hành thí nghiệm. Ở lô thí nghiệm thì chỉ thấy virus xuất hiện trong dịch swab sau 4 ngày công cường độ. Đồng thời, khi xem xét kết quả phân lập virus CDV và kết quả theo dõi các biểu hiện lâm sàng được trình bày ở bảng 3.4 đã chỉ rõ phần nào cơ chế sinh bệnh carê. Sau khi xâm nhập vào cơ thể chó ở lô đối chứng, virus sẽ nhân lên ở các mô bạch huyết ở đường hô hấp và lúc này chó sẽ xuất hiện cơn sốt đầu tiên và suy giảm số lượng tế bào

Bảng 4. Kết quả phân lập virus CDV ở các lô chó thí nghiệm

Lô chó		4 ngày	7 ngày	10 ngày	14 ngày	21 ngày
Lô đối chứng	Chó 1	+	+	+	+	+
	Chó 2	+	+	+	+	+
	Chó 3	+	+	+	+	+
Lô thí nghiệm	Chó 4	+	-	-	-	-
	Chó 5	+	-	-	-	-
	Chó 6	+	-	-	-	-

Ghi chú: +: có virus; -: không có virus

lympho trong máu xuất hiện sau thời gian 3-6 ngày gây nhiễm (Krakowka et al., 1980), điều này làm giảm sức đề kháng của con vật giúp virus tấn công các tế bào đích trong cơ thể và nhân lên về số lượng và độc lực nên sau 12-13 ngày gây nhiễm thì chó mới xuất hiện cơn sốt thứ 2 và ở 14-16 ngày sau khi gây nhiễm chó có các biểu hiện triệu chứng điển hình của bệnh.

4. KẾT LUẬN

Vaccin vô hoạt carê được chế từ chủng CDV-VNUA-768 đã được đánh giá khả năng bảo hộ trên 6 chó thí nghiệm. Hiệu giá kháng thể tăng dần sau khi tiêm vaccin lần thứ nhất và tiêm vaccin lặp lại lần hai. Hiệu giá kháng thể đạt giá trị trên giá trị tối hạn sau 21 ngày tiêm, sau đó đạt cực đại sau 35 ngày tiêm (hiệu giá trung bình là 1,54 > 0,3). Ở các ngày 42 tới 49 ngày sau khi tiêm, hiệu giá kháng thể giảm dần và vẫn đạt trên ngưỡng giá trị tối hạn ở 49 ngày (hiệu giá trung bình là 0,97 > 0,3). Sau 21 ngày gây nhiễm với chủng CDV-HUA-04H, giá trị OD_{tb} của lô tiêm vaccin vô hoạt CDV đạt 0,56 lớn hơn giá trị tối hạn (0,3). Vaccin vô hoạt CDV đã cho đáp ứng miễn dịch kéo dài trong thời gian công cường độc ở lô chó tiêm vaccin. Điều này có ý nghĩa quan trọng giúp cho người làm nghiên cứu có thể xác định được độ dài miễn dịch cũng như thời gian bảo hộ của vaccin carê trên thực tế và giúp các nghiên cứu sản xuất vaccin trong việc thử nghiệm sản phẩm trên quy mô lớn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

An, D.J., Kim, T.Y., Song, D.S., Kang, B.K., Park, B.K. (2008). An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper. *J Virol Methods*, 147: 244-249.

Appel, M., Gillespie, J.E. (1972). Canine distemper monograph. *Handbook of Virus Research*, Edited by Gard S, Hallaver C and Meyer KF New York: Springer-Verlag, pp. 34-63.

Appel, M.J., Yates, R.A., Foley, G.L., Bernstein, J.J., Santinelli, S., Spelman, L.H., Miller, L.D., Arp, L.H., Anderson, M., Barr, M., et al. (1994). Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *J Vet Diagn Invest*, 6: 277-288.

Blixenkroner-Møller, M., Svansson, V., Have, P., Örvell, C., Appel, M., Rode Pedersen, I., Henrik

Dietz, H., Henriksen, P. (1993). Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Veterinary Microbiology*, 37: 163-173.

Bussell, R.H., Karzon, D.T. (1965). Canine distemper virus in ferret, dog and bovine kidney cell cultures. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 17: 163-182.

Frolich, K., Czupalla, O., Haas, L., Hentschke, J., Dedek, J., Fickel, J. (2000). Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. *Vet Microbiol*, 74: 283-292.

Keawcharoen, J., Theamboonlers, A., Jantaradsamee, P., Rungsipipat, A., Poovorawan, Y., Oraveerakul, K. (2005). Nucleotide sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand. *Veterinary microbiology*, 105: 137-142.

Krakowka, S., Higgins, R.J., Koestner, A. (1980). Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am J Vet Res.*, 41: 284-292.

Lan, N.T., Yamaguchi, R., Inomata, A., Furuya, Y., Uchida, K., Sugano, S., Tateyama, S. (2006). Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Veterinary microbiology*, 115: 32-42.

Latha, D., Geetha, M., Ramadass, P., Narayanan, R.B. (2007). Evaluation of ELISA based on the conserved and functional middle region of nucleocapsid protein to detect distemper infection in dogs. *Veterinary microbiology*, 120: 251-260.

Martella, V., Pratelli, A., Cirone, F., Zizzo, N., Decaro, N., Tinelli, A., Foti, M., Buonavoglia, C. (2002). Detection and genetic characterization of canine distemper virus (CDV) from free-ranging red foxes in Italy. *Molecular and cellular probes*, 16: 77-83.

Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J. (1999). *Veterinary virology*. Academic press.

Norrbj, E., Utter, G., Orvell, C., Appel, M.J. (1986). Protection against canine distemper virus in dogs after immunization with isolated fusion protein. *Journal of Virology*, 58: 536-541.

Sidhu, M.S., Husar, W., Cook, S.D., Dowling, P.C., Udem, S.A. (1993). Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV genome sequence. *Virology*, 193: 66-72.

Wilson, S., Siedek, E., Thomas, A., King, V., Stirling, C., Plevová, E., Salt, J., Sture, G. (2014). Influence of maternally-derived antibodies in 6-week old dogs for the efficacy of a new vaccine to protect dogs against virulent challenge with canine distemper virus, adenovirus or parvovirus. *Trials in Vaccinology*, 3: 107-113.