

NGHIÊN CỨU TÍNH SINH MIỄN DỊCH TRÊN LỢN CỦA KHÁNG NGUYÊN PCV2-ORF2 TÁI TỔ HỢP BẰNG HỆ THỐNG BIỂU HIỆN BACULOVIRUS

*Đặng Vũ Hoàng¹, Trần Thị Thanh Hà¹, Nguyễn Thị Huyền¹,
Đặng Thị Kiều Anh¹, Lý Đức Việt¹, Nguyễn Thủy Duyên¹,
Nguyễn Thế Vinh¹, Hoàng Việt Hưng², Takehiro Kokuho³*

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên tái tổ hợp ORF2 của PCV2 và đánh giá khả năng bảo hộ chống lại vi rút PCV2 trên lợn. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở liều 10^6 và 10^7 pfu/ml, sau 42 ngày tiêm kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp, hiệu giá kháng thể kháng vi rút PCV2 trong huyết thanh lợn tăng mạnh so với nhóm đối chứng ($p < 0,05$ đối với liều 10^6 và $p < 0,01$ đối với liều 10^7 pfu/ml). Ngoài ra, ở liều 10^7 pfu/ml, kháng thể đặc hiệu kháng PCV2 bắt đầu xuất hiện từ ngày 21 ($p < 0,05$) và đạt đỉnh ở ngày thứ 42 ($p < 0,01$) khi so với nhóm đối chứng tiêm PBS. Kết quả này cho thấy kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp có tính sinh miễn dịch cao. Nhằm đánh giá khả năng bảo hộ của kháng thể kháng vi rút PCV2, chúng tôi tiến hành công cường độc lợn thí nghiệm ở 42 ngày sau khi tiêm và hàm lượng ARN của PCV2 được đánh giá bằng phản ứng RT-PCR bán định lượng (Semi-quantitative RT-PCR) sau 2 tuần công cường độc. Kết quả thí nghiệm cho thấy, hàm lượng ARN của PCV2 giảm mạnh cả ở hạch lympho và trong máu ở nhóm lợn tiêm kháng nguyên ORF2 khi so sánh với nhóm lợn đối chứng ($p < 0,05$). Từ các kết quả thu được, chúng tôi có thể kết luận, kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp có tính sinh miễn dịch cao và là ứng viên tiềm năng để sản xuất vắc xin tái tổ hợp phòng bệnh cho lợn có liên quan đến vi rút PCV2 ở Việt Nam.

Từ khóa: virus PCV2 của lợn, khung đọc mở 2, protein tái tổ hợp, vắc xin tiểu phần

Investigation on the immunogenicity in pigs of recombinant PCV2-ORF2 antigen based on baculovirus expression system

*Dang Vu Hoang, Tran Thi Thanh Ha, Nguyen Thi Huyen,
Dang Thi Kieu Anh, Ly Duc Viet, Nguyen Thuy Duyen,
Nguyen The Vinh, Hoang Viet Hung, Takehiro Kokuho*

SUMMARY

In this study, the immunogenicity of recombinant ORF2 antigen of PCV2 was investigated and their ability to protect piglets against a PCV2 challenge was evaluated. The studied results showed that at doses of 10^6 and 10^7 pfu/ml, PCV2 specific antibodies were significantly increased in serum of the experimental pigs injected with ORF2 antigen in comparison with the control pig group ($p < 0,05$ for dose of 10^6 pfu/ml and $p < 0,01$ for dose of 10^7 pfu/ml). Additionally, at high dose (10^7 pfu/ml), PCV2 specific antibodies appeared at 21 days after first injection ($p < 0,05$) and reached at peak at 42 days ($p < 0,01$) when compared to PBS injection as the control. In order to assess the ability for protecting the piglets against PCV2 challenge, at day 42 after immunization with recombinant ORF2 antigen, the animals were challenged with virulent PCV2 strain and the efficacy in reducing the PCV2 load in lymph node and serum were determined by Semi-quantitative RT-PCR at day 14 after challenge. The results showed that,

¹ Bộ môn Hóa sinh Miễn dịch - Viện Thú y

² Đại học Y Hà Nội,

³ Viện Thú y Nhật Bản

the viral loads were decreased significantly in both lymph nodes and serum when compared to the control ($p < 0,05$). Finally, we can conclude that recombinant ORF2 antigen possessed high immunogenicity and this antigen would be a potential candidate for recombinant vaccine production against PCV2 in Viet Nam.

Keywords: porcine circovirus type 2, open reading frame 2, recombinant protein, subunit vaccine.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong nhiều năm qua, hệ thống baculovirus đã được sử dụng để biểu hiện nhiều loại protein khác nhau. Nhiều công trình khoa học đã chỉ ra rằng hệ thống baculovirus có thể được sử dụng để tạo ra nhiều loại protein tái tổ hợp mong muốn với số lượng đáng kể (Martijan và cs., 2007). Khả năng biến nạp vào nhiều loại tế bào động vật khác nhau của baculovirus cũng đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu (Gould, 2004). Ngoài ra, khả năng sửa đổi sau dịch mã (post-translational modification) chính xác cũng được xem như một đặc tính quan trọng của hệ thống này. Trong những năm gần đây, hệ thống baculovirus được sử dụng như công cụ hữu ích để “vận chuyển” hay “biểu hiện” vacxin (Yu-Chen và cs., 2008; Vlak and Keus, 1990; Hou et al., 2003; Li và cs., 2003). Hệ thống này cũng đã được sử dụng như vector biểu hiện để chế tạo vacxin chống lại virus SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome-corona virus) (Bai và cs., 2008). Monique M. van Oers và cộng sự đã biểu hiện thành công rất nhiều loại glycoprotein của virus bằng hệ thống biểu hiện baculovirus với mục đích sản xuất vacxin (Van và cs., 2006).

PCV lần đầu tiên được mô tả như một sự tập nhiễm trên tế bào PK15 (Tischer và cs., 1982) và sau đó được phân loại thuộc họ *Circoviridae* (Lukert và cs., 1995). Các virion của PCV có dạng hình cầu, đường kính 17 nm, có chứa DNA sợi đơn vòng tròn và có kích thước khoảng 17kb (Tischer và cs., 1982). Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng PCV tập nhiễm từ tế bào PK15 không tham gia vào Hội chứng còi cọc sau cai sữa (PMWS). Tuy nhiên, những nghiên cứu gần đây cho thấy PCV tiếp tục được phát hiện trong Hội chứng PMWS (Ellis và cs., 1998). Để giải thích cho hiện tượng này, những phân tích xa hơn về bộ

gen đã chứng minh rằng có 2 loại PCV hoàn toàn khác biệt, PCV loại 1 (hay còn được biết với ký hiệu PCV1) và PCV loại 2 (hay còn được biết với ký hiệu PCV2), trong đó PCV1 không có khả năng gây bệnh, còn PCV2 tham gia vào Hội chứng PMWS. Khả năng tương tác khác biệt với các kháng thể đơn dòng của PCV1 và PCV2 đã chỉ ra sự khác biệt về tính kháng nguyên của chúng (Allan và cs., 1998).

Hiện nay có rất nhiều loại vacxin đã được phát triển chống lại PCV2 như vacxin nhược độc, vacxin vô hoạt (chỉ có capsid), vacxin tái tổ hợp sử dụng gen mã hóa cho capsid protein nhờ vector mang, vacxin tiểu phần (Porcilis PCV) và vacxin ARN. Những bằng chứng khoa học gần đây đã cho thấy ORF2 là protein có tính miễn dịch chủ yếu (Shen và cs., 2008). Khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của vacxin tiểu phần ORF2, được phát triển bằng hệ thống biểu hiện baculovirus, chống lại PCV2 trong điều kiện thực địa đã được mô tả trong nghiên cứu gần đây của Paolo Martelli (Paolo Martelli và cs., 2011). Kết quả cho thấy hệ thống baculovirus là sự lựa chọn tối ưu trong ứng dụng sản xuất vacxin tái tổ hợp phòng PCV2 hiện nay.

Trong những nghiên cứu gần đây, chúng tôi đã ứng dụng thành công hệ thống biểu hiện baculovirus để tạo ra một số protein tái tổ hợp quan trọng dùng trong chẩn đoán và làm nguyên liệu để sản xuất vacxin như protein ORF2 tái tổ hợp của virus PCV2 (Đặng Vũ Hoàng và cs., 2016) và gần đây là protein GP5 tái tổ hợp của virus PRRS (Trần Thị Thanh Hà và cs., 2017). Protein tái tổ hợp bằng hệ thống baculovirus vẫn giữ được các đặc tính sinh học vốn có (được nhận diện bởi kháng thể tự nhiên) và có tính sinh miễn dịch cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá tính sinh miễn dịch

của kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp của virus PCV2. Nghiên cứu này có ý nghĩa quan trọng và là cơ sở khoa học để tiến tới nghiên cứu phát triển và hoàn thiện vacxin tái tổ hợp phòng bệnh có liên quan đến virus PCV2 tại Việt Nam.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

2.1.1. Nghiên cứu đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp trên lợn

2.1.2. Nghiên cứu thử thách cường độ với virus PCV2 trên lợn được tiêm kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp ELISA: sử dụng kit ELISA thương mại (PCV Kit, Shenzhen Lvshiyuan Biotechnology Co., LTD, Trung Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.2. Phương pháp RT-PCR bán định lượng (Semi-quantitative RT-PCR): theo Dang và cs., 2009 và 2010.

2.2.3. Phương pháp thử thách cường độ với PCV2, mổ khám và thu thập bệnh phẩm: theo quy trình thường quy của Bộ môn Hóa sinh Miễn dịch - Viện Thú y.

2.2.4. Phương pháp chiết tách ARN: sử dụng kit chiết tách thương mại, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.5. Phương pháp Plaque Assay: theo quy trình thường quy của Viện Thú y Nhật Bản.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu tính sinh miễn dịch của kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp của virus PCV2 trên lợn

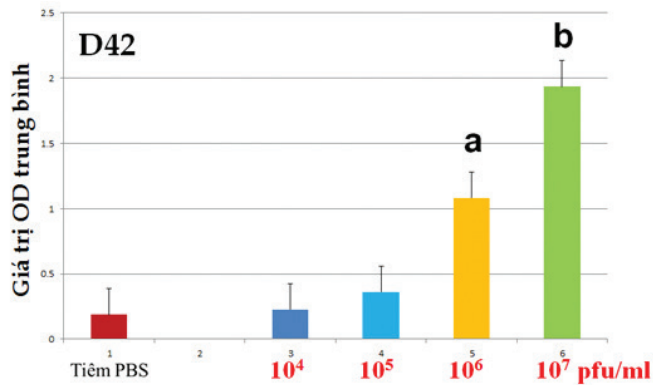
Kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp được sản xuất bằng hệ thống biểu hiện baculovirus là sản phẩm khoa học thuộc đề tài cấp Nhà nước do Bộ môn Hóa sinh Miễn dịch (Viện Thú y) làm chủ trì. Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp, thí nghiệm xác định liều được bố trí như bảng 1.

Bảng 1. Thí nghiệm xác định liều của kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp

Ngày tiêm	Đối chứng (n = 3)	Tiêm kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp (n = 3)	Ghi chú
Ngày 0	Tiêm PBS	Kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp kết hợp bổ trợ Freund hoàn toàn (Freund's complete adjuvant) Liều 10^4 , 10^5 , 10^6 và 10^7 pfu/ml	
Ngày 7	Tiêm PBS	Kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp kết hợp bổ trợ Freund không hoàn toàn (Freund's incomplete adjuvant)	
Ngày 21	Tiêm PBS	Kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp kết hợp bổ trợ Freund không hoàn toàn	

Lợn 21 ngày tuổi không có kháng thể kháng virus PRRS, dịch tả lợn, PCV2, được sử dụng cho nghiên cứu này. Mẫu huyết thanh lợn được thu thập ở ngày 42 sau khi tiêm mũi kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp đầu tiên và hàm lượng kháng thể kháng virus PCV2 trong huyết thanh lợn được đánh giá bằng kit PCV ELISA thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kết quả được trình bày ở hình 1.

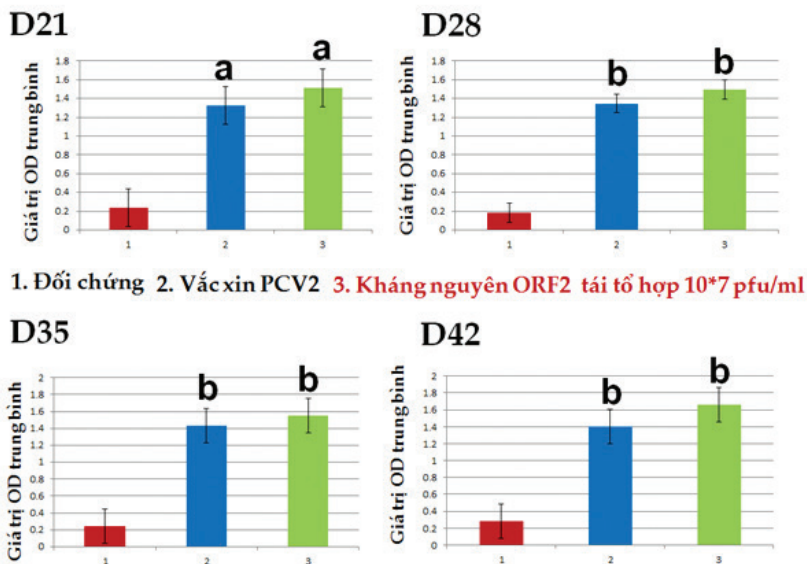
Kết quả ở hình 1 cho thấy, hàm lượng kháng thể kháng virus PCV2 trong huyết thanh lợn ở liều 10^6 và 10^7 pfu/ml tăng mạnh so với nhóm đối chứng tiêm PBS ($p < 0,05$ đối với liều 10^6 pfu/ml và $p < 0,01$ đối với liều 10^7 pfu/ml). Kết quả này cho thấy, kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp kích thích tạo kháng thể đặc hiệu kháng virus PCV2 trong huyết thanh lợn thí nghiệm. Nhằm nghiên cứu xác định biến động hàm lượng kháng thể kháng virus PCV2 trong huyết thanh lợn được



Hình 1. Hàm lượng kháng thể kháng virus PCV2 trong huyết thanh lợn được tiêm kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp ở các liều khác nhau tại ngày 42 sau khi tiêm.
a: $p < 0,05$ b: $p < 0,01$ so với đối chứng tiêm PBS

tiêm kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp theo thời gian, chúng tôi lựa chọn liều kháng nguyên tối ưu là 10^7 pfu/ml (giá trị $p < 0,01$) cho nghiên cứu tiếp theo và đánh giá biến động hàm lượng kháng thể kháng PCV2 tại các thời điểm khác nhau: 21, 28, 35 và 42 ngày để lựa chọn thời

điểm thử thách cường độ phù hợp. Đối chứng dương tiêm vaccin PCV2 thương mại (2 mũi, mũi thứ nhất cách mũi thứ hai 14 ngày với liều sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Đối chứng âm tiêm PBS. Kết quả được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Biến động hàm lượng kháng thể kháng virus PCV2 trong huyết thanh lợn được tiêm kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp tại 21, 28, 35 và 42 ngày sau khi tiêm.
Đối chứng dương: Vaccin PCV2 thương mại, Đối chứng âm: Tiêm PBS

Kết quả ở hình 2 cho thấy, ở liều 10^7 pfu/ml, kháng thể đặc hiệu kháng PCV2 bắt đầu xuất hiện từ ngày 21 ($p < 0,05$) và đạt đỉnh ở ngày thứ 42

($p < 0,01$) khi so với nhóm tiêm PBS. Khi so sánh giữa hai nhóm tiêm vaccin PCV2 thương mại và kháng nguyên ORF2, chúng tôi nhận thấy: biến

động hàm lượng kháng thể kháng PCV2 có tỷ lệ tương đồng rất cao; cụ thể: không có sự khác biệt được ghi nhận giữa nhóm tiêm kháng nguyên ORF2 và vaccin PCV2 thương mại tại các thời điểm kiểm tra. Kết quả cho thấy kháng nguyên tái tổ hợp ORF2 của virus PCV2 bằng hệ thống baculovirus có tính sinh miễn dịch cao và thời điểm 42 ngày sau khi tiêm kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp là phù hợp để tiến hành thử thách cường độc.

3.2. Nghiên cứu thử thách cường độc với virus PCV2 trên lợn được tiêm kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp

Nhằm đánh giá khả năng bảo hộ của kháng

nguyên ORF2 tái tổ hợp, chúng tôi tiến hành thí nghiệm thử thách cường độc tại ngày 42 sau khi tiêm kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp của PCV2 và vaccin PCV2 thương mại thông qua biến động hàm lượng ARN của virus PCV2 trong hạch lympho và trong máu bằng kỹ thuật RT-PCR bán định lượng (Semi-quantitative RT-PCR) theo quy trình được công bố bởi Đặng Vũ Hoàng và cs., 2009 và 2010. Lợn được mổ khám và thu thập mẫu bệnh phẩm (máu và hạch lympho) ở ngày 14 sau khi thử thách cường độc với PCV2 (hình 3) và tiến hành đánh giá lượng ARN của virus PCV2 trong máu và hạch lympho bằng phương pháp Semi-quantitative RT-PCR.



Hình 3. Mổ khám thu bệnh phẩm sau 14 ngày công cường độc

Để tiến hành phương pháp Semi-quantitative RT-PCR, chúng tôi thiết kế một cặp mồi (primer) đặc hiệu cho house keeping gene GAPDH dùng

làm gen tham chiếu (reference gene).

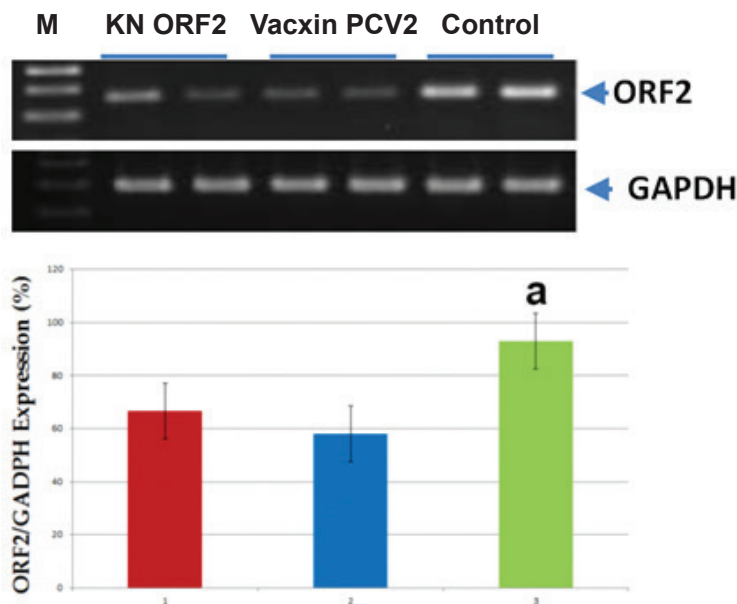
Trình tự primer sử dụng trong RT-PCR bán định lượng được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Trình tự primer dùng trong Semi-quantitative RT-PCR

Tên gen	Trình tự primer	Kích thước sản phẩm PCR	Nguồn tham khảo
ORF2	PoORF2-F: ACGTATCCAAGGAGGCGTTTC PoORF2-R: TCACTTAGGGTGAAGTGGGGGGT	702bp	Đặng Vũ Hoàng và cs., 2016
GAPDH	PoGAPDH-F: AGAAGAGCAGAGCGAGGATG PoGAPDH-R: TGTGGTCATGAGTCCTTCCA	651bp	Nygard và cs., 2003 Wang và cs., 2013

Theo Ann-Britt Nygard và cs., việc lựa chọn gen tham chiếu dùng trong nghiên cứu biểu hiện gen ở lợn đặc biệt quan trọng. Hiện có nhiều gen tham chiếu được sử dụng trong nghiên cứu đánh giá biểu hiện gen ở lợn như Beta actin, GAPDH, Beta-2-microglobulin, TATA binding protein, Ribosomal protein L4.... Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn GAPDH vì đã ứng dụng thành công gen tham chiếu này trong những nghiên cứu trước đây cũng như từ những kết quả được công bố bởi các nhóm nghiên cứu khác (Ann-Britt Nygard và cs., 2007; Wang và cs., 2013).

Kết quả thí nghiệm thử thách công cường độc cho thấy, hàm lượng ARN của virus PCV2 giảm mạnh cả ở hạch lympho (hình 4) và trong máu (hình 5) của nhóm lợn tiêm kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp khi so sánh với nhóm đối chứng tiêm PBS. Cụ thể: mức độ biểu hiện của gen ORF2 ở hạch lympho giảm mạnh, từ $92,88 \pm 10,06$ (%) ở nhóm đối chứng xuống còn $66,53 \pm 11,59$ (%) đối với nhóm tiêm kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp và $57,98 \pm 2,96$ (%) đối với nhóm tiêm vaccin PCV2 thương mại (hình 4).



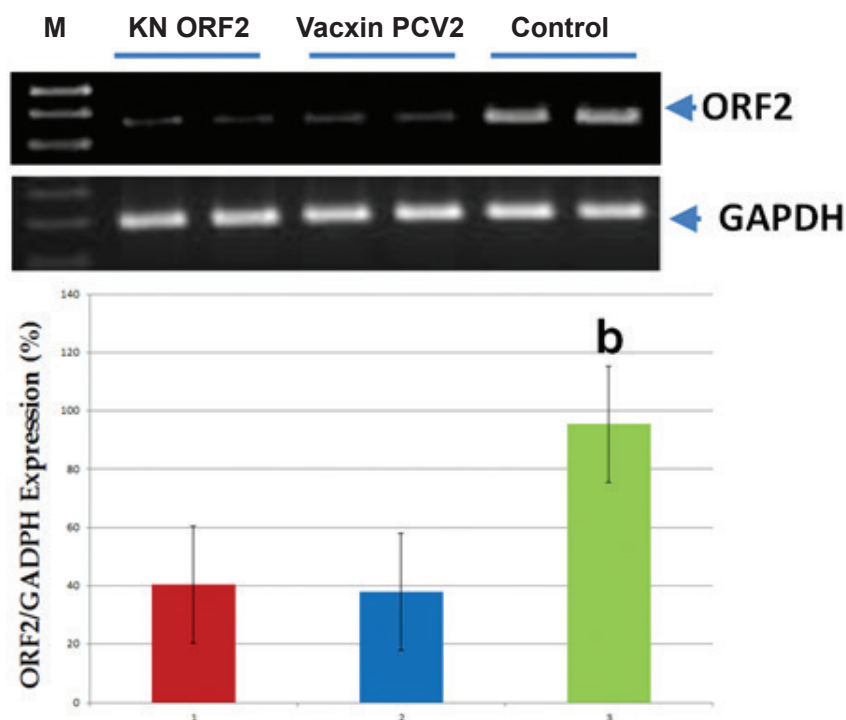
Hình 4. Mức độ biểu hiện ORF2/GAPDH (%) trong hạch lympho sau 14 ngày thử thách công cường độc. 1. Kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp; 2. Vaccin PCV2 thương mại; 3. Đối chứng
âm a: $p < 0,05$ khi so sánh với nhóm 1 và nhóm 2

Không có sự khác biệt trong biểu hiện gen ORF2 của virus PCV2 giữa nhóm tiêm kháng nguyên tái tổ hợp ORF2 và tiêm vaccin thương mại được ghi nhận tại hạch lympho trong nghiên cứu này (hình 4).

Kết quả tương tự cũng quan sát được trong máu của lợn thí nghiệm và được trình bày ở hình 5, trong đó mức độ biểu hiện của gen ORF2 trong huyết thanh lợn ở nhóm tiêm kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp và nhóm tiêm vaccin

PCV2 thương mại, lượng ARN của virus PCV2 giảm mạnh khi so sánh với nhóm đối chứng (giá trị $p < 0,01$).

Một sự tương đồng cao về khả năng bảo hộ chống lại PCV2 giữa nhóm tiêm vaccin PCV2 thương mại và nhóm tiêm kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp, trong đó không có sự khác biệt về mức độ biểu hiện gen ORF2 trong huyết thanh lợn giữa 2 nhóm được ghi nhận trong thí nghiệm này (giá trị $p > 0,05$). Kết quả này một lần nữa



Hình 5. Mức độ biểu hiện ORF2/GAPDH (%) trong máu sau 14 ngày thử thách cường độc. 1. Kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp; 2. Vacxin PCV2 thương mại; 3. Đối chứng âm b: $p < 0,01$ khi so sánh với nhóm 1 và nhóm 2

kháng định: kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp bằng hệ thống biểu hiện baculovirus là ứng viên tiềm năng để sản xuất vaccin tái tổ hợp phòng bệnh có liên quan đến PCV2 ở Việt Nam.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Từ những kết quả thu được trong nghiên cứu này, chúng tôi có thể kết luận:

1. Kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp sản xuất bằng hệ thống biểu hiện baculovirus có tính sinh miễn dịch cao.

2. Kháng thể kháng lại kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp có khả năng bảo hộ chống lại virus PCV2, giảm lượng virus trong tổ chức lympho và trong máu của lợn khi thử thách cường độc với PCV2 thực địa (giá trị $p < 0,05$).

3. Kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp bằng hệ

thống baculovirus hoàn toàn phù hợp và là ứng viên tiềm năng để phát triển vaccin tái tổ hợp phòng bệnh do PCV2 gây ra tại Việt Nam.

4.2. Kiến nghị

Tiếp tục nghiên cứu phát triển và hoàn thiện vaccin tái tổ hợp ORF2 phục vụ công tác phòng, chống dịch bệnh có liên quan đến virus PCV2 tại Việt Nam.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp Nhà nước: “Nghiên cứu biểu hiện protein tái tổ hợp của virus PCV2 để chế tạo sinh phẩm chẩn đoán và làm nguyên liệu tiến tới sản xuất vaccin” do TS. Đặng Vũ Hoàng làm chủ trì và được Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn tài trợ thông qua Chương trình Công nghệ Sinh học Nông nghiệp và Thủy sản (2014-2017).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Martijan AL, German RA, Klass M, Van GW (2007). Production of sumoylated proteins using a baculovirus expression system. *J. Virol. Methods*, 139: 189-194
2. Gould AR (2004). Virus evolution: disease emergence and spread. *Aust. J. experim. Agric.*, 44: 1085-1094
3. Yu-Chen H, Kun Y, Tzong-Yuan W (2008). Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens. *Expert Review of Vaccines* 7: 363-371
4. Bai B, Lu X, Meng J, Hu Q, Mao P, Lu B, Chen Z, Yuan Z, Wang H (2008). Vaccination of mice with recombinant baculovirus expressing spike or nucleocapsid protein of SARS-like coronavirus generates humoral and cellular immune responses. *Mol Immunol.* 45: 868-75
5. Hui-Gang Shen, Ji-Yong Zhou, Zhen-Yu Huang, I Jun-Qing Guo, Gang Xing, Jia-Ling He, Yan Yan and Li-Yang Gong (2008). Protective immunity against porcine circovirus 2 by vaccination with ORF2-based DNA and subunit vaccines in mice. *Journal of General Virology*, 89, 1857–1865
6. Paolo Martelli, Luca Ferrari, Marina Morganti, Elena De Angelis, Paolo Bonilauri, Stefano Guazzetti, Antonio Caleffi, Paolo Borghetti (2011). One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. *J. Vet. Microb.* 149; 339–351
7. Allan, G. M., F. McNeilly, S. Kennedy, B. Daft, E. G. Clarke, J. A. Ellis, D. M. Haines, B. M. Meehan, and B. M. Adair (1998). Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J. Vet. Diagn. Investig.* 10:3–10
8. Dang VH, Nguyen TH, Lee GS, Choi KC and Jeung EB. (2009). *In vitro* exposure to xenoestrogens evokes the transcriptional level of growth hormone gene and its release via estrogen receptor-dependent pathway in a rat pituitary cell line, GH3. *Steroids* 74:707-714
9. Dang VH, Choi KC and Jeung EB. (2010). Membrane-impermeable estrogen is involved in regulation of calbindin-D9k expression via non-genomic pathways in a rat pituitary cell line, GH3 cells. *Toxicol in Vitro* 2010; 24:1229-1236
10. Ann-Britt Nygard, Claus B Jørgensen, Susanna Cirera and Merete Fredholm (2007). Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR.
11. Jiying Wang, Yanping Wang, Huaizhong Wang, Xiaojing Hao1, Ying Wu, Jianfeng Guo (2013). Selection of Reference Genes for Gene Expression Studies in Porcine Whole Blood and Peripheral Blood Mononuclear Cells under Polyinosinic:Polycytidylic Acid Stimulation Australas. *J. Anim. Sci.* Vol. 27, No. 4 : 471-478
12. Đặng Vũ Hoàng, Trương Quốc Phong, Trần Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Huyền, Takehiro Kokuho và cs. (2016). Ứng dụng hệ thống biểu hiện baculovirus nhằm sản xuất protein ORF2 tái tổ hợp của virus PCV2. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y số 2*.
13. Trần Thị Thanh Hà, Lý Đức Việt, Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Thị Lương, Đặng Thị Kiều Anh, Đặng Vũ Hoàng và Takehiro Kokuho (2017). Đánh giá ảnh hưởng tiềm năng của Interferon alpha trong đáp ứng miễn dịch của lợn được tiêm kháng nguyên GP5 tái tổ hợp của virus tai xanh. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y số 1*.
14. Van Oers MM (2006). Vaccines for viral and parasitic diseases produced with baculovirus vectors. *Adv Virus Res.*;68:193-253
15. Tischer, I., H. Gelderblom, W. Vettermann, and M. A. Koch. (1982). A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295:64–66
16. Lukert, P., G. F. de Boer, J. L. Dale, P. Keese, M. S. McNulty, J. W. Randles, and I. Tischer. (1995). The Circoviridae, p. 166–168.
17. Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D., Haines, D., (1998). Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 39 (1), 44–51

Ngày nhận 22-11-2017

Ngày phản biện 9-4-2018

Ngày đăng 1-7-2018