

Hiệu quả ức chế virus gây bệnh Gumboro của interferon trên gà thực nghiệm

Nguyễn Thị Thanh Giang^{1*}, Nguyễn Đăng Quân¹, Hồ Quảng Đồ²

¹Trung tâm Công nghệ sinh học TP Hồ Chí Minh

²Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 10/2/2020; ngày chuyển phản biện 20/2/2020; ngày nhận phản biện 3/4/2020; ngày chấp nhận đăng 15/4/2020

Tóm tắt:

Nghiên cứu hiệu quả điều trị bệnh Gumboro của interferon gà tái tổ hợp (recombinant chicken interferon, rChIFN) khi sử dụng chỉ mỗi interferon alpha gà (ChIFN- α) hay có sự kết hợp với interferon gamma (ChIFN- γ) được thực hiện trên gà 3 tuần tuổi. Đầu tiên gà được công cường độc với virus Gumboro độc lực cao (1×10^5 ELD₅₀ mỗi con) bằng cách nhốt mắt, nhốt mũi; sau 8 giờ xử lý với virus, gà được điều trị bằng cách nhốt mắt và nhốt mũi với rChIFN ứng với 1 trong 6 nhóm nghiệm thức. Nhóm sử dụng rChIFN- α 100 μ g/con, tỷ lệ gà được bảo hộ là 56,67%, tỷ lệ sống là 93,33%; nhóm sử dụng rChIFN- α 100 μ g/con kết hợp rChIFN- γ (1 μ g/con) tỷ lệ gà được bảo hộ là 70,00%, tỷ lệ sống là 93,33%; nhóm sử dụng rChIFN- α 10 μ g/con tỷ lệ gà được bảo hộ là 36,67%, tỷ lệ sống là 80,00%; nhóm sử dụng rChIFN- α 10 μ g/con kết hợp rChIFN- γ (1 μ g/con) tỷ lệ gà được bảo hộ là 53,33%, tỷ lệ sống là 86,67%. Trong khi đó, nhóm đối chứng dương (gà nhiễm virus, không được điều trị), gà không được bảo hộ (tỷ lệ nhiễm bệnh là 100%) và tỷ lệ sống chỉ đạt 60,00%; đối chứng âm (gà không nhiễm virus, không xử lý với rChIFN) gà hoàn toàn không nhiễm bệnh và tỷ lệ sống 100%. Kết quả này cho thấy, sử dụng rChIFN- α làm tăng tỷ lệ bảo hộ, tỷ lệ sống khi gà bị nhiễm bệnh Gumboro theo nồng độ sử dụng. Đồng thời sử dụng rChIFN- α kết hợp rChIFN- γ đã làm tăng hiệu quả điều trị so với sử dụng chỉ mỗi rChIFN- α .

Từ khóa: gà, Gumboro, protein tái tổ hợp, rChIFN- α , rChIFN- γ .

Chỉ số phân loại: 4.3

Đặt vấn đề

Gumboro là bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm, chủ yếu xảy ra ở gà và gà tây. Bệnh có đặc điểm là gây viêm túi Fabricius, xuất huyết cơ ngực, cơ đùi, làm hoại tử thận, đặc biệt là làm suy giảm hệ thống miễn dịch hoặc mất khả năng đáp ứng miễn dịch đối với vaccine phòng các bệnh khác và dễ bị cảm nhiễm các bệnh truyền nhiễm khác. Bệnh thường xảy ra khi gà ở giai đoạn 3-6 tuần tuổi. Bệnh gây tổn thất kinh tế rất lớn do tỷ lệ nhiễm bệnh có thể lên đến 100% và tỷ lệ chết có thể từ 20 đến 50% [1]. Bệnh do Birnavirus tác động vào túi Fabricius gây suy giảm miễn dịch, do đó không thể sử dụng kháng sinh để điều trị và rất khó để khu trú ổ dịch khi có dịch bệnh xảy ra. Ngày nay, với sự phát triển mạnh mẽ của lĩnh vực protein tái tổ hợp, các protein đã được tạo ra dễ dàng, số lượng lớn, giá thành rẻ và được ứng dụng phổ biến để hỗ trợ trong chăn nuôi. Trong số này, interferon được đặc biệt chú ý vì nó có thể ức chế sự tăng sinh của virus, ức chế sự phát triển của các tế bào khối u, do vậy interferon được sử dụng như một chất điều trị không đặc hiệu cho mọi nhiễm trùng do virus. Ở gà, rChIFN- α đã được chứng minh có hiệu quả ức chế sự nhân lên của virus trong các điều kiện *in vitro* và *in vivo* [2-8]. Ngoài

ra, với sự phát triển mạnh mẽ của các nghiên cứu protein tái tổ hợp, việc biểu hiện các protein có hoạt tính sinh học, số lượng lớn và giá thành rẻ đã được thực hiện dễ dàng. Hệ thống biểu hiện protein tái tổ hợp phổ biến hiện nay là *Pichia pastoris* vì nó có nhiều ưu điểm, đặc biệt là nó cung cấp môi trường thích hợp để protein tái tổ hợp tiết ra ngoài môi trường, gấp cuộn và thực hiện các biến đổi sau dịch mã. Hơn nữa, thành phần môi trường nuôi cấy *Pichia pastoris* lại đơn giản, chi phí lên men thấp, các phương pháp sử dụng, chủng, vector biểu hiện đều đã được thương mại hóa, rất phù hợp cho sản xuất lớn. Trung tâm Công nghệ sinh học TP Hồ Chí Minh đã nghiên cứu biểu hiện thành công rChIFN- α từ nấm men *Pichia pastoris* và chứng minh protein này có hoạt tính kháng virus gây bệnh Gumboro ở điều kiện *in vitro* [9]. Chính vì thế, trong nghiên cứu này chúng tôi thực hiện đánh giá hiệu quả điều trị của protein tái tổ hợp ở điều kiện *in vivo* trong thời gian 2018-2019.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Đối tượng thí nghiệm: gà giống Tam Hoàng 1 ngày tuổi từ trại gà giống ở Vĩnh Long, được nuôi tại trại thực nghiệm,

*Tác giả liên hệ: Email: nttgiang84@yahoo.com.vn

Efficiency of inhibiting infectious bursal disease virus in vivo

Thi Thanh Giang Nguyen^{1*}, Dang Quan Nguyen¹,
Quang Do Ho²

¹Biotechnology Center of Ho Chi Minh city

²College of Agriculture, Can Tho University

Received 10 February 2020; accepted 15 April 2020

Abstract:

A study on the efficiency of recombinant chicken interferon (rChIFN) in the treatment of Gumboro disease by using only chicken interferon alpha (ChIFN- α) or combining with interferon gamma (ChIFN- γ) was carried out in 3-week-old chickens. The experiment was performed as the following procedure: firstly, chickens were exposed to eye/nasal drops with virulent Gumboro disease virus with a dose of 1×10^5 ELD₅₀ per chick. After 8 hours of challenges virus, chickens were exposed to eye/nasal drops with rChIFN- α for one of the six experimental groups. The chickens were used rChIFN- α 100 μ g/chick having the protection and the survival rate in respectively 56.67% and 93.33%. The chickens were used rChIFN- α 10 μ g/chick combining with rChIFN- γ (1 μ g/chick) having the protection and the survival rate in respectively 70.00% and 93.33%. The chickens were used rChIFN- α 10 μ g/chick having the protection and the survival rate in respectively 36.67% and 80.00%. The chickens were used rChIFN- α 10 μ g/chick combining with rChIFN- γ (1 μ g/chick) having the protection and the survival rate in respectively 53.33% and 86.67%. Meanwhile, the positive control group (chickens were infected, untreated), chickens were not protected (100% infection rate) and survival rate was only 60.00%; negative control group (non-viral chickens, not treated with rChIFN), whole chickens were not infected and 100% survival rate. The results suggested that using rChIFN- α increased the protection and survival rate of Gumboro infected chickens depending on rChIFN concentration. Concurrently, using rChIFN- α combined with rChIFN- γ had increased the treatment efficiency compared to using only rChIFN- α .

Keywords: chicken, Gumboro, rChIFN- α , rChIFN- γ , recombinant protein.

Classification number: 4.3

Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ. Gà được kiểm tra kháng thể thụ động kháng virus Gumboro khi đạt 3 tuần tuổi tại Phòng thí nghiệm virus học, Bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ. Tất cả gà cho kết quả âm tính với phản ứng kết tủa khuếch tán trên thạch (AGP-Agarose Gel Precipitation) sẽ được sử dụng làm thí nghiệm. Tổng số gà thí nghiệm là 225 con (45 con sử dụng khảo sát khả năng gây độc của rChIFN- α , rChIFN- γ và 180 con thực hiện trong thí nghiệm khảo sát điều trị của hiệu quả rChIFN).

Vật liệu thí nghiệm: virus Gumboro có độc lực cao (NAVETCO); rChIFN- α ; rChIFN- γ (Trung tâm Công nghệ sinh học TP Hồ Chí Minh); kháng nguyên và kháng thể chuẩn kháng virus Gumboro (Australian animal health laboratory, CSIRO, Australia); agarose và các sinh phẩm cần thiết dùng trong phản ứng AGP; bộ kit FlockCheck IBD-XR (IDEXX Laboratories, USA); vaccine Gumboro, vaccine đậu gà, vaccine cúm gia cầm, vaccine Newcastle, vaccine tụ huyết trùng gia cầm (NAVETCO); trứng gà có phôi 9-11 ngày tuổi (dùng thí nghiệm tính liều gây chết 50% phôi - ELD₅₀: embryo lethal dose 50%).

Phương pháp thí nghiệm

Chuẩn bị gà làm thí nghiệm: gà 1 ngày tuổi được mua từ trại về, nuôi ổn định và chăm sóc đến khi gà đạt 3 tuần tuổi mới đưa vào thí nghiệm. Trong quá trình nuôi, gà được phòng các bệnh truyền nhiễm khác trừ bệnh Gumboro bằng vaccine hoặc kháng sinh theo quy trình (bảng 1). Gà được lấy máu ở tĩnh mạch cánh để kiểm tra kháng thể thụ động kháng virus Gumboro ở 7, 14 và 21 ngày tuổi bằng phản ứng AGP. Lúc gà đạt 21 ngày tuổi, tất cả gà thí nghiệm đều không còn kháng thể kháng virus Gumboro và được đưa vào sử dụng.

Bảng 1. Quy trình phòng bệnh cho gà thí nghiệm.

Ngày tuổi	Tên vaccine	Cách tiêm ngừa
3	Newcastle	Nhỏ mắt mũi
10	Đậu	Chung qua cánh
15	Cúm	Tiêm dưới da cổ
21	Newcastle	Nhỏ mắt mũi
30	Cúm	Tiêm dưới da cổ
40	Tụ huyết trùng	Tiêm dưới da cổ

Chuẩn độ xác định liều gây chết 50% phôi gà (ELD₅₀ - Embryo lethal dose 50%) ELD₅₀ (ml) của virus Gumboro: phôi gà 10 ngày tuổi (trứng gà có trống được thu từ gà mẹ không có kháng thể kháng Gumboro) được chia ngẫu nhiên thành 8 nhóm, mỗi nhóm 5 phôi. Dịch virus Gumboro được pha thành những nồng độ theo lg từ 10^{-1} đến 10^{-8} , được tiêm vào màng nhũn của phôi, mỗi phôi được tiêm 0,2 ml dịch virus ở các nồng độ khác nhau. Sau khi tiêm virus vào màng nhũn của phôi, dùng parafilm hàn chỗ tiêm và

buồng hơi thật, tiếp tục ấp trứng ở 37°C. Soi trứng hàng ngày để phát hiện phôi chết. Sau 5 ngày tiêm virus, mổ toàn bộ phôi để tính liều gây chết trên phôi [10]. Cách tính liều ELD₅₀ (50% embryo lethal dose - liều gây chết 50% phôi thử nghiệm) dựa vào phương pháp của Reed và Muench [11].

Xác định liều an toàn của rChIFN trên gà 3 tuần tuổi: thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên trên gà 3 tuần tuổi, sạch bệnh, không có kháng thể kháng Gumboro. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, tổng gà thí nghiệm là 45 con, chia làm 3 nhóm. Nhóm xử lý rChIFN-α hoặc rChIFN-γ, gà được nhỏ mắt/mũi với 0,2 ml dịch rChIFN hàm lượng 100 µg/gà. Nhóm đối chứng, gà nhỏ mắt/mũi 0,2 ml nước muối sinh lý 9%. Sau khi được xử lý rChIFN, gà được theo dõi 72 giờ, ghi nhận các biểu hiện và tỷ lệ sống của gà thí nghiệm.

Xác định hiệu quả của rChIFN trong điều trị bệnh Gumboro: thí nghiệm được lặp lại 3 lần, tổng gà mỗi nhóm là 30 con. Gà 3 tuần tuổi, không có kháng thể kháng Gumboro, được chia làm 6 nhóm ngẫu nhiên (bảng 2). Các nhóm gồm: 4 nhóm điều trị sử dụng rChIFN-α với các nồng độ 10 µg/con hoặc 100 µg/con có hoặc không có kết hợp với rChIFN-γ (1 µg/con); nhóm đối chứng nhiễm virus, không được điều trị (ĐC (+)); nhóm đối chứng gà khỏe mạnh, không nhiễm virus, không sử dụng rChIFN (ĐC (-)). Mỗi gà được lây nhiễm với virus Gumboro liều 1×10⁵ ELD₅₀ bằng cách nhỏ mắt/mũi; sau 8 giờ nhiễm virus, mỗi gà được điều trị bằng 1 liều rChIFN với nồng độ khác nhau phụ thuộc vào nhóm thí nghiệm. Theo dõi và ghi nhận tỷ lệ gà bệnh, gà chết. Gà chết sẽ được mổ khám để ghi nhận triệu chứng. Sau 3 tuần kể từ ngày gây nhiễm virus, sẽ thu huyết thanh gà để kiểm tra kháng thể kháng Gumboro.

Bảng 2. Bố trí thử nghiệm xác định hiệu quả của rChIFN trong điều trị bệnh Gumboro.

Nhóm	Số lượng gà	Virus	Đường cấp
rChIFN-α 10 µg/con	30	+	Mắt/mũi
rChIFN-α/ γ (10-1 µg/con)	30	+	Mắt/mũi
rChIFN-α 100 µg/con	30	+	Mắt/mũi
rChIFN-α/ γ (100-1 µg/con)	30	+	Mắt/mũi
Đối chứng virus (ĐC (+))	30	+	Mắt/mũi
Đối chứng không tác động (ĐC (-))	30	-	Mắt/mũi

Chỉ tiêu theo dõi:

Tỷ lệ gà được bảo hộ (%) = [(Số gà thí nghiệm - Số gà bệnh)/Số gà thí nghiệm] x 100

Tỷ lệ gà chết (%) = (Số gà chết/Số gà thí nghiệm) x 100

Tỷ lệ gà sống (%) = 100 - tỷ lệ gà chết

Hiệu giá kháng thể (HGKT) kháng Gumboro: log₁₀ hiệu giá = 1,09(log₁₀^{S/P}) + 3,36 (theo hướng dẫn của bộ kit phát hiện

kháng thể kháng Gumboro, kit FlockCheck IBD-XR). Trong đó, S/P là tỷ lệ dương tính của mẫu. Chỉ số S/P ≤ 0,2 tương ứng với kết quả âm tính (mẫu huyết thanh âm không chứa kháng thể kháng Gumboro); chỉ số S/P > 0,2 tương ứng với kết quả dương tính (gà đã được tiêm ngừa hoặc đã tiếp xúc với virus Gumboro). HGKT ≥ 396: mẫu huyết thanh dương tính với kháng thể kháng virus Gumboro.

Kết quả và thảo luận

Chuẩn độ xác định chỉ số ELD₅₀/0,1 ml của virus gây bệnh Gumboro trên phôi

Sau 3-5 ngày tiêm 0,2 ml dịch virus Gumboro (IBDV) cho mỗi phôi gà, số phôi gà chết được tổng hợp trong bảng 3. Kết quả khảo sát những phôi chết có bệnh tích đặc trưng do virus Gumboro như: xuất huyết da chân, da đầu, đặc biệt ở vùng đại não, có những điểm hoại tử ở thận, xuất huyết ở gan và màng nhện. Những biểu hiện này cũng giống như miêu tả của Hồ Thị Việt Thu và Nguyễn Đức Hiền (2012) [12] về phôi gà chết do virus Gumboro, phôi chết sẽ có các biểu hiện như sung huyết và xuất huyết điểm ở da, bụng căng phồng ứ nước, xuất huyết ở vùng đầu, có những điểm hoại tử nhỏ và xuất huyết ở gan, sung huyết ở phổi, lách nhạt màu.

Bảng 3. Tỷ lệ phôi gà chết ở các nồng độ.

Độ pha loãng virus	Số thật		Số tổng hợp		Tỷ lệ	
	Sống (phôi)	Chết (phôi)	Sống (phôi)	Chết (phôi)	Số chết (phôi)	Tỷ lệ chết (%)
10 ¹	0	5	0	24	24/24	100,00
10 ²	0	5	0	19	19/19	100,00
10 ³	0	5	0	14	14/14	100,00
10 ⁴	1	4	1	9	9/10	90,00
10 ⁵	2	3	3	5	5/8	62,50
10 ⁶	3	2	6	2	2/8	25,00
10 ⁷	5	0	11	0	0/11	0,00
10 ⁸	5	0	16	0	0/16	0,00

Bảng 3 cho thấy, ở độ pha loãng 10⁵ đạt được nồng độ virus thấp nhất gây chết trên 50% phôi và độ pha loãng 10⁶ đạt được nồng độ virus cao nhất gây chết dưới 50% phôi với tỷ lệ tương ứng là 62,5% và 25,0%. Tính toán theo công thức của Reed - Muench, xác định liều ELD₅₀ là 10^{5,33} (ở độ pha loãng 1:10^{5,33}, khi tiêm 0,2 ml dịch virus Gumboro sẽ gây chết 50% phôi thí nghiệm - 0,2 ml huyền dịch virus ban đầu có chứa 10^{5,33} liều gây chết 50% phôi).

Sau khi xác định được liều ELD₅₀ trên phôi, nghiên cứu đã sử dụng liều 1×10⁵ ELD₅₀ để gây nhiễm cho gà thí nghiệm.

Xác định liều an toàn của rChIFN trên gà thí nghiệm

Sau 72 giờ được nhỏ mắt/mũi với rChIFN- α hoặc rChIFN- γ , gà thí nghiệm không có biểu hiện bệnh, vẫn ăn uống, sinh hoạt như thường. So với nhóm đối chứng, gà được nhỏ mắt/mũi với 0,2 ml nước muối sinh lý, gà không có biểu hiện khác lạ giữa các nhóm và toàn bộ gà đều sống.

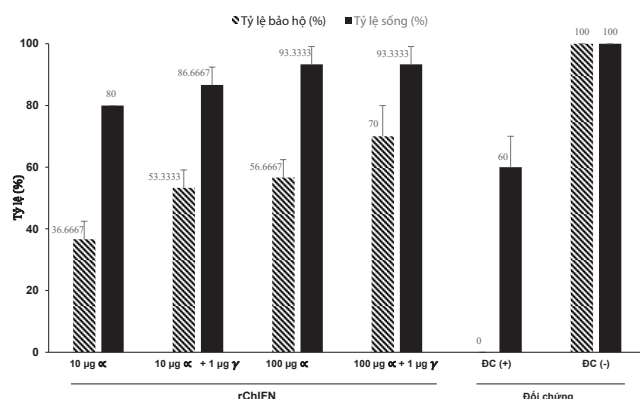
Bảng 4. Nồng độ rChIFN- α không ảnh hưởng đến sự sống của gà thí nghiệm.

Nhóm	Số gà thí nghiệm	Số gà sống khỏe mạnh
rChIFN- α 100 μ g/con	15	15
rChIFN- γ 100 μ g/con	15	15
Đối chứng	15	15

Kết quả bảng 4 cho thấy, hàm lượng rChIFN sử dụng là an toàn cho gà thí nghiệm.

Hiệu quả của rChIFN trong điều trị bệnh Gumboro

Sau 24 giờ nhiễm virus Gumboro, gà được điều trị bằng rChIFN. Kết quả điều trị cho thấy, rChIFN có hiệu quả kháng virus, tỷ lệ gà được bảo hộ và tỷ lệ sống cao, khác biệt so với nhóm gà không được điều trị. Kết quả chi tiết được thể hiện qua hình 1.



Hình 1. Biểu đồ tỷ lệ bảo hộ, tỷ lệ sống của gà ở các nhóm thí nghiệm. ĐC(+): gà nhiễm virus, không được điều trị; ĐC(-): gà không nhiễm virus, không sử dụng rChIFN; rChIFN: các nhóm gà nhiễm virus và được điều trị bằng rChIFN.

Kết quả thể hiện trong hình 1 cho thấy, ở nhóm ĐC (+), gà nhiễm virus và không được điều trị, sau 3-5 ngày nhiễm virus, toàn bộ gà trong nhóm có các biểu hiện đặc trưng của bệnh Gumboro như ủ rũ, lông xù, run rẩy tụ tập thành từng đám, gà tự mổ vào hậu môn, quanh hậu môn dính đầy phân, tiêu chảy phân nhiều nước và có màu hơi trắng. Toàn bộ các triệu chứng này hoàn toàn trùng hợp với mô tả về bệnh Gumboro trên gà của Cosgrove [13]. Bên cạnh đó, những gà chết trong toàn bộ thí nghiệm đều được mổ khám bệnh tích, nhận thấy toàn bộ gà chết đều có triệu chứng: túi Fabricius sưng hoặc xuất huyết; xuất huyết cơ đùi, cơ ngực. Ngoài ra,

vẫn ghi nhận được các biểu hiện bệnh tích như xuất huyết giữa dạ dày cơ và dạ dày tuyến; thận sưng; tuyến ức có điểm hoặc mảng xuất huyết. Các biểu hiện này là đặc trưng bệnh tích của bệnh Gumboro [14]. Điều này chứng tỏ, virus sử dụng trong thí nghiệm là virus cường độc và lượng sử dụng đủ mạnh để có thể gây bệnh cho 100% gà thí nghiệm và tỷ lệ chết lên đến 40%. Ở nhóm này, gà hoàn toàn không được bảo hộ và tỷ lệ sống chỉ đạt 60%, các tỷ lệ này khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nhóm còn lại. Giữa các nhóm có xử lý rChIFN, tỷ lệ gà sống có sự khác nhau, dao động 80-93,33%, tuy nhiên khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ bảo hộ ở các nhóm có sử dụng rChIFN có sự khác biệt rõ rệt, nhóm sử dụng rChIFN- α 100 μ g/con phối hợp rChIFN- γ (1 μ g/con) đạt tỷ lệ bảo hộ cao nhất (70%). Kế đến là nhóm sử dụng rChIFN- α 100 μ g/con và rChIFN- α 10 μ g/ml phối hợp rChIFN- γ (1 μ g/con), tỷ lệ bảo hộ tương ứng đạt 56,67 và 53,33%. Tỷ lệ bảo hộ thấp nhất là ở nhóm sử dụng rChIFN- α 10 μ g/con, đạt 36,67%. Kết quả đã chứng tỏ rChIFN có hiệu quả trong điều trị bệnh Gumboro.

Đặc biệt, khi sử dụng rChIFN- α kết hợp rChIFN- γ , hiệu quả bảo hộ tăng rõ rệt và khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ gà được bảo hộ khi sử dụng rChIFN- α 10 μ g/con có kết hợp rChIFN- γ (53,33%) cao hơn so với nhóm chỉ sử dụng rChIFN- α 10 μ g/con (36,67%). Tương tự, tỷ lệ bảo hộ của nhóm sử dụng rChIFN- α 100 μ g/con kết hợp rChIFN- γ (70,00%) cũng cao hơn khác biệt so với nhóm chỉ sử dụng rChIFN- α 100 μ g/con. Đặc biệt, tỷ lệ bảo hộ ở nhóm sử dụng rChIFN- α 10 μ g/con có kết hợp rChIFN- γ (53,33%) tương đương với nhóm rChIFN- α 100 μ g/con (56,67%). Điều này cho thấy, rChIFN- α khi sử dụng kết hợp với rChIFN- γ đã làm giảm lượng rChIFN- α sử dụng, mà tỷ lệ bảo hộ vẫn không giảm.

Interferon là một trong những cytokine có khả năng kháng lại virus bằng cách cản trở sự tổng hợp RNA và protein của virus [15]. Ở gia cầm, interferon alpha gà (ChIFN- α) đã được chứng minh là có tác dụng làm giảm tình trạng nhiễm virus Newcastle khi cho uống với liều cao [4]; có khả năng phòng và trị nhiều bệnh do virus khác như virus cúm H9N2 [16], virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm [6], virus gây bệnh Gumboro và Newcastle trên gà thương phẩm [5]. Điều này giúp giải thích kết quả nghiên cứu của chúng tôi khi sử dụng rChIFN- α , gà sẽ được bảo hộ và tỷ lệ bảo hộ phụ thuộc nồng độ sử dụng. Ngoài ra, ChIFN- α có khả năng kháng virus cao nhưng không có yếu tố kích thích đại thực bào, trong khi đó, ChIFN- γ tuy có tính kháng virus kém hơn nhưng lại có khả năng tác động tích cực đến đại thực bào MHC lớp II [17], nên việc kết hợp ChIFN- α và ChIFN- γ sẽ giúp tăng hiệu quả điều trị nên sẽ làm giảm tỷ lệ gà bệnh và chết. Theo nghiên cứu của Sekellick và cs (1998) [7] trên tế bào xơ phôi gà, trường hợp sử dụng kết hợp ChIFN- α và

ChIFN- γ thì số lượng vết tan hình thành (do virus gây ra) giảm đi 8 lần và các vết tan có kích thước nhỏ hơn, đồng thời nồng độ các ChIFN khi tác động phối hợp thấp hơn nồng độ của các ChIFN khi tác động riêng lẻ khoảng 4 lần và cho hiệu quả kháng virus gấp 2,5 lần. Kết quả nghiên cứu thực tế của chúng tôi cũng hoàn toàn phù hợp với các lý thuyết trên, khi sử dụng rChIFN- α có kết hợp rChIFN- γ thì tỷ lệ bảo hộ khác biệt có ý nghĩa so với nhóm chỉ sử dụng rChIFN- α .

HGKT kháng Gumboro khi sử dụng rChIFN

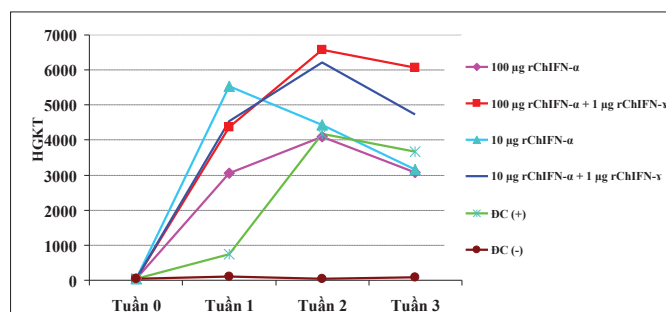
Trước khi gây nhiễm virus Gumboro 1 tuần (tuần 0 thí nghiệm), và trong 3 tuần thí nghiệm (khi đã gây nhiễm virus Gumboro), gà được lấy máu tại thời điểm đầu mỗi tuần để kiểm tra kháng thể kháng Gumboro. HGKT được xác định bằng bộ kit FlockCheck IBD-XR (IDEXX Laboratories, USA), với HGKT ≥ 396 thì mẫu huyết thanh sẽ dương tính với kháng thể kháng virus Gumboro.

Kết quả về HGKT của gà trong thí nghiệm được trình bày cụ thể trong bảng 5 và hình 2.

Bảng 5. HGKT của gà trước và sau gây nhiễm virus Gumboro.

Nhóm	HGKT			
	Tuần 0	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3
100 μ g rChIFN- α	45,2 $\pm$ 37,9	3056 $\pm$ 1454	4094 $\pm$ 397	3079 $\pm$ 816
100 μ g rChIFN- α + 1 μ g rChIFN- γ	53,3 $\pm$ 49,4	4378 $\pm$ 1952	6577 $\pm$ 1192	6069 $\pm$ 1160
10 μ g rChIFN- α	54,2 $\pm$ 28,6	5530 $\pm$ 1226	4426 $\pm$ 735	3156 $\pm$ 554
10 μ g rChIFN- α + 1 μ g rChIFN- γ	53,2 $\pm$ 37,9	4542 $\pm$ 1908	6212 $\pm$ 953	4732 $\pm$ 625
ĐC (+)	54,3 $\pm$ 28,6	740 $\pm$ 349	4168 $\pm$ 1013	3660 $\pm$ 589
ĐC (-)	50,8 $\pm$ 38,9	108 $\pm$ 22	52,7 $\pm$ 19	80,2 $\pm$ 19

ĐC (+): gà được gây nhiễm virus và không được điều trị bằng rChIFN; ĐC (-): gà không nhiễm virus, không điều trị bằng rChIFN. Các số trong cùng một cột mang những chữ số mũ khác nhau thì sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 2. Biểu đồ HGKT trước và sau khi gây nhiễm virus Gumboro.

Bảng 5 cho thấy, trước khi nhiễm virus, toàn bộ gà thí nghiệm đều có kết quả âm tính (tuần 0) khi kiểm tra kháng thể kháng Gumboro. Sau 1 tuần gây nhiễm virus, gà ở các nhóm thí nghiệm có tiếp xúc với virus đều biểu hiện đáp

ứng miễn dịch thông qua gia tăng HGKT. Cùng thời điểm này, gà ở nhóm đối chứng âm (gà không nhiễm virus, không xử lý với rChIFN) hoàn toàn âm tính với virus Gumboro.

Hình 2 và bảng 5 cho thấy, sau 1 tuần gây nhiễm với virus Gumboro và sử dụng rChIFN, lượng kháng thể của gà tăng nhanh và khác nhau ở các nhóm, cao nhất là ở nhóm sử dụng 100 μ g rChIFN- α (HGKT: 5530), kế đến là 2 nhóm có sử dụng kết hợp với rChIFN- γ (HGKT: 4378 và 4542); tiếp theo là nhóm sử dụng 100 μ g rChIFN- α (HGKT: 3056) và thấp nhất là ở nhóm ĐC (+) (HGKT: 740). Khi xử lý thống kê, HGKT của gà ở các nhóm được xử lý với rChIFN khác biệt, nhưng lại khác biệt có ý nghĩa so với nhóm ĐC (+). Kết quả này chứng tỏ rằng, gà sau khi bị bệnh có khả năng đáp ứng miễn dịch tốt đối với virus Gumboro. Đồng thời rChIFN cũng làm cơ thể gà tăng cường các đáp ứng miễn dịch để kháng lại virus, HGKT của các nhóm có sử dụng rChIFN tăng cao hơn 4-7 lần so với ĐC (+).

Sau 2 tuần nhiễm virus, hàm lượng kháng thể gà ở nhóm ĐC (+) tăng lên mạnh mẽ, đạt đỉnh và HGKT không khác biệt so với các nhóm có sử dụng rChIFN. Hai nhóm sử dụng rChIFN- α kết hợp rChIFN- γ và nhóm sử dụng 100 μ g rChIFN- α cũng đạt HGKT cao sau 2 tuần nhiễm virus. So với các nhóm sử dụng mỗi rChIFN- α , các nhóm có sử dụng kết hợp rChIFN- γ vẫn có HGKT cao nhất (6577 và 6212 tương ứng với nhóm sử dụng 100 μ g và 10 rChIFN- α), mặc dù khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Nhóm sử dụng 10 μ g rChIFN- α HGKT đạt đỉnh sau 1 tuần nhiễm virus và sau 2 tuần bắt đầu giảm, tuy nhiên vẫn cao và không khác biệt so với các nhóm khác. Theo lý thuyết, khi gà đang bị bệnh hoặc khỏi bệnh sẽ tạo ra một lượng kháng thể rất cao do chính virus gây bệnh Gumboro đã tạo ra, kháng thể đạt hàm lượng cao nhất từ 10-12 ngày sau khi gây nhiễm và giảm dần theo thời gian [14]. Hơn nữa, interferon được xem là yếu tố quan trọng nhất trong sức đề kháng không đặc hiệu của cơ thể đối với virus, bằng cách kích thích hàng loạt tế bào có thẩm quyền miễn dịch như đại thực bào, tế bào giết tự nhiên, tế bào lympho..., các tế bào này giúp tăng cường hoạt lực cho cơ thể [4]. Điều đó cho thấy, sau 2 tuần nhiễm virus, kháng thể tạo ra ở các nhóm gà thí nghiệm đều tuân theo quy luật tự nhiên và rChIFN- α kết hợp rChIFN- γ đã tăng cường khả năng đáp ứng miễn dịch của gà khi bị nhiễm bệnh. Sau 3 tuần nhiễm virus, những gà còn sống hầu hết sẽ khỏi bệnh, nồng độ kháng thể lúc này bắt đầu giảm so với tuần 2. HGKT lúc này vẫn đạt cao nhất ở các nhóm có sử dụng kết hợp với rChIFN- γ , tuy nhiên sự khác biệt này so với các nhóm còn lại không có ý nghĩa thống kê.

Các kết quả về HGKT cho thấy, khi gà nhiễm virus, có sử dụng rChIFN- α hoặc sử dụng kết hợp rChIFN- γ sẽ giúp cơ thể gà kích hoạt nhanh các cơ chế miễn dịch, HGKT tăng

cao, tăng nhanh sau 1 tuần nhiễm virus. Đồng thời, HGKT vẫn duy trì ở mức cao sau 2 tuần tiếp theo, nên giúp gà được bảo hộ và đạt tỷ lệ sống cao hơn so với nhóm ĐC (+).

Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, rChIFN- α có hiệu quả kháng lại virus gây bệnh Gumboro ở nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{con}$ và 100 $\mu\text{g}/\text{con}$ với tỷ lệ bảo hộ tương ứng là 36,67 và 56,67%. Đồng thời, khi kết hợp rChIFN- α cùng rChIFN- γ (1 $\mu\text{g}/\text{con}$), tỷ lệ gà được bảo hộ tăng lên, đạt 53,33 và 70,00% tương ứng với nhóm gà sử dụng rChIFN- α 10 $\mu\text{g}/\text{con}$ và 100 $\mu\text{g}/\text{con}$. Bên cạnh đó, đánh giá hiệu quả kháng thể cũng cho thấy, rChIFN- α không ảnh hưởng đến khả năng đáp ứng miễn dịch của gà khi bị nhiễm virus. Tuy nhiên, khi sử dụng kết hợp rChIFN- γ và rChIFN- α , khả năng đáp ứng miễn dịch của gà tăng cao và duy trì đỉnh nồng độ kháng thể sau hơn 2 tuần nhiễm virus.

Tóm lại, khi sử dụng rChIFN- α kết hợp hoặc không kết hợp với rChIFN- γ hoàn toàn có hiệu quả trong điều trị bệnh Gumboro cho gà khi được cấp bằng đường nhỏ mắt/mũi. Hiệu quả bảo hộ đạt 37-70% và tỷ lệ gà sống đạt 80-93% phụ thuộc vào liều rChIFN sử dụng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Phạm Sĩ Lăng và Nguyễn Thiện (2004), *Một số bệnh mới do virus ở gia súc, gia cầm nhập nội và biện pháp phòng trị*, NXB Nông nghiệp, tr.170-171.
- [2] F. Hou, K. Liu, T. Shen, B. Zhou, R. Cao, P. Li, P. Chen (2011), "Antiviral activity of rChIFN- α against vesicular stomatitis virus and Newcastle disease virus: a novel recombinant chicken interferon- α showed high antiviral activity", *Research in Veterinary Science*, **91**(3), pp.e73-e79.
- [3] K.W. Jarosinski, W. Jia, M.J. Sekellick, P.I. Marcus, K.A. Schat (2001), "Cellular responses in chickens treated with IFN- α orally or inoculated with recombinant Marek's disease virus expressing IFN- α ", *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **21**(5), pp.287-296.
- [4] P.I. Marcus, L.V.D. Heide, M.J. Sekellick (1999), "Interferon action on avian viruses. I. Oral administration of chicken interferon-alpha ameliorates Newcastle disease", *Journal of Interferon & Cytokine*

Research, **19**(8), pp.881-885.

- [5] C.W. Mo, Y.C. Cao, B.L. Lim (2001), "The in vivo and in vitro effects of chicken interferon α on infectious bursal disease virus and Newcastle disease virus infection", *Avian Diseases*, **45**(2), pp.389-399.
- [6] J. Pei, M.J. Sekellick, P.I. Marcus, I.S. Choi, E.W. Collisson (2001), "Chicken interferon type I inhibits infectious bronchitis virus replication and associated respiratory illness", *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **21**(12), pp.1071-1077.
- [7] M.J. Sekellick, J.W. Lowenthal, T.E. O'neil, P.I. Marcus (1998), "Chicken interferon types I and II enhance synergistically the antiviral state and nitric oxide secretion", *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **18**(6), pp.407-414.
- [8] C. Xia, J. Liu, Z.G. Wu, C.Y. Lin, M. Wang (2004), "The interferon- α genes from three chicken lines and its effects on H9N2 influenza viruses", *Animal Biotechnology*, **15**(1), pp.77-88.
- [9] Võ Thị Minh Tâm, Nguyễn Thị Thanh Giang, Nguyễn Đăng Quân, Nguyễn Quốc Bình (2014), "Tạo dòng, biểu hiện và xác định hoạt tính sinh học của interferon gà tái tổ hợp thu nhận từ hệ thống nấm men *pichia pastoris*", *Tạp chí Sinh học*, **36**(1se), tr.216-225.
- [10] S.B. Hitchner (1970), "Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs", *Poultry Science*, **49**(2), pp.511-516.
- [11] L.J. Reed and H. Muench (1938), "A simple method of estimating fifty per cent endpoints", *American Journal of Epidemiology*, **27**(3), pp.493-497.
- [12] Hồ Thị Việt Thu và Nguyễn Đức Hiền (2012), *Giáo trình bệnh truyền nhiễm gia súc gia cầm*, NXB Đại học Cần Thơ, tr.244-248.
- [13] A.S. Cosgrove (1962), "An apparently new disease of chickens: avian nephrosis", *Avian Diseases*, **6**(3), pp.385-389.
- [14] Lê Văn Năm (2004), *Bệnh Gumboro ở gà và biện pháp phòng trị*, NXB Nông nghiệp, tr.1-53.
- [15] I.R. Tizard (2004), "Cytokines and the immune system", *Veterinary Immunology - An Introduction*, 7th ed, Elsevier, USA, pp.133-143.
- [16] S. Meng, L. Yang, C. Xu, Z. Qin, H. Xu, Y. Wang, L. Sun, W. Liu (2011), "Recombinant chicken interferon- α inhibits H9N2 influenza virus in vivo by oral administration", *J. Interferon Cytokine Res.*, **20**(5), pp.1-6.
- [17] M. Suresh, K. Karaca, D. Foster, J.M. Sharma (1995), "Molecular and functional characterization of turkey interferon", *Journal of Virology*, **69**(12), pp.8159-8163.