Khả năng ức chế virus gây bệnh Gumboro trên gà 3 tuần tuổi của Interferon Alpha gà

The ability inhibition Gumboro disease virus in 3-week-old chickens of chicken Interferon Alpha

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

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Nông nghiệp, Đại học Cần Thơ, Việt Nam

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

THÔNG TIN

DOI: 10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.15.1.1017.2020

Ngày nhận: 13/04/2020

Ngày nhận lại: 18/09/2020

Duyệt đăng: 20/10/2020

Từ khóa:

Interferon, Gumboro, gà,
rChIFN- α

TÓM TẮT

Các bệnh dịch do virus luôn là mối đe dọa thường xuyên và gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi gà ở Việt Nam. Interferon alpha gà tái tổ hợp (rChIFN- α , recombinant chicken interferon alpha) đã được biểu hiện thành công trên hệ thống *pichia pastoris* và có hoạt tính kháng virus. Do vậy nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu xác định hiệu quả của rChIFN- α trên gà 3 tuần tuổi nhiễm virus Gumboro. Thí nghiệm tiến hành trên gà 3 tuần tuổi không có kháng thể kháng Gumboro. Gà sẽ được lây nhiễm virus Gumboro với liều 5×10^4 EDL₅₀/con, sau 24 giờ lây nhiễm virus, gà được điều trị bằng cách sử dụng rChIFN- α nhỏ mắt/mũi với một trong các liều 0,1 μ g/con; 1 μ g/con; 10 μ g/con hoặc 100 μ g/con. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi điều trị bằng rChIFN- α 0,1 μ g/con, tỉ lệ gà được bảo hộ và tỉ lệ gà sống tương ứng 46,7% và 80%; nhóm gà sử dụng rChIFN- α 1 μ g/con, tỉ lệ gà được bảo hộ và tỉ lệ gà sống tương ứng 60,0% và 86,7%; hai nhóm gà được điều trị bằng rChIFN- α 10 μ g/con và 100 μ g/con có kết quả như nhau, tỉ lệ gà được bảo hộ và gà sống tương ứng 66,7% và 93,3%. Trong khi đó, nhóm đối chứng dương (gà nhiễm virus, không được điều trị), gà không được bảo hộ (tỉ lệ nhiễm bệnh là 100%) và tỉ 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 tỉ lệ sống 100%. Điều này đã chứng minh rChIFN- α có hiệu quả sử dụng trong điều trị bệnh Gumboro trên gà và hiệu quả này phụ thuộc liều sử dụng. Thêm nữa, hiệu giá kháng thể của gà trong thí nghiệm cho thấy, sự đáp ứng miễn dịch của gà trong các nhóm sử dụng rChIFN- α cũng không khác biệt so với gà chỉ nhiễm virus Gumboro, cho thấy rChIFN- α không gây ảnh hưởng đến đáp ứng miễn dịch của gà.

ABSTRACT

Virus-infectious diseases are permanent threats and cause serious lost for chicken industry of our country. Recombinant chicken interferon alpha (rChIFN- α) were expressed successfully

on yeast *pichia pastoris* and was functional antiviral. The objective of this study was determined recombinant chicken interferon alpha (rChIFN- α) effectiveness in 3-week-old chickens infected infectious bursal disease virus (IBDV). In the present study, we used 3-week-old chickens without IBDV antibodies. Each 3-week-old chickens were infected virulent Gumboro disease virus with dose of 5×10^4 ELD₅₀. After 24 hours infected virus, they were exposed to eye/nasal drops with one of doses 0.1 $\mu\text{g}/\text{chick}$; 1 $\mu\text{g}/\text{chick}$; 10 $\mu\text{g}/\text{chick}$ or 100 $\mu\text{g}/\text{chick}$. The results suggested treatment with rChIFN- α 0.1 $\mu\text{g}/\text{chick}$, the chickens' protected and survival rate were 46.7% and 80% respectively. Group of chickens were treated rChIFN- α 1 $\mu\text{g}/\text{chick}$, the protected and survival rate of chickens respectively 60.0% and 86.7%; The same result with chickens were treated rChIFN- α 10 $\mu\text{g}/\text{chick}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{chick}$, the chickens' protected and survival rate were 66.7% and 93.3%, respectively. Meanwhile, the positive control group (chicken infected virus, untreated), unprotected chickens (infection rate was 100%) and survival rate was only 60,00%. The negative control (chickens uninfected viruses, untreated with rChIFN- α), completely uninfected and 100% survival chickens. The result suggested that rChIFN- α have effective treating Gumboro disease and depends on the dose used. In addition, the chickens' antibody titres shown that the chickens' immune response in rChIFN- α groups was not different than the chickens infected only Gumboro disease virus, suggested that rChIFN- α did not affect the chickens' immune response.

Keywords:

Interferon, Gumboro, chicken, rChIFN- α

1. Giới thiệu

Trên gia cầm, bệnh do virus gây ra thường nguy hiểm và ảnh hưởng đến ngành chăn nuôi. Trong đó, bệnh Gumboro là bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm, chủ yếu diễn ra ở gà và gà tây. Bệnh có đặc điểm gây viêm túi Fabricius, xuất huyết cơ ngực, cơ đùi, làm hoại tử thận và đặc biệt làm suy giảm hệ miễn dịch hoặc làm mất khả năng đáp ứng miễn dịch đối với vaccine phòng các bệnh khác và dễ bị cảm nhiễm các bệnh truyền nhiễm khác (Pham & Nguyen, 2004). Hiện tại, bệnh Gumboro không có biện pháp điều trị hiệu quả, người chăn nuôi gia cầm chủ yếu dựa vào chế độ chăm sóc và các lịch trình tiêm chủng để phòng ngừa và kiểm soát sự lây lan của căn bệnh này. Interferon alpha gà (ChIFN- α) là một cytokine có tiềm năng ứng dụng lớn trong công nghiệp chăn nuôi gia cầm. ChIFN- α có đặc tính ức chế sự hoạt động của mRNA dẫn đến ức chế quá trình nhân lên của virus. Do đặc tính đáp ứng không đặc hiệu, ChIFN- α được coi là yếu tố kích hoạt miễn dịch. Ngoài ra ChIFN- α được chú ý vì nó là hợp chất: có phổ hoạt động rộng (tác động lên nhiều loại virus khác nhau trên gia cầm), gần giống với các hợp chất tự nhiên, hiệu quả cao, tiện lợi khi sử dụng. Các gene mã hóa interferon alpha gà tái tổ hợp (rChIFN- α) đã lần lượt được tạo dòng, biểu hiện, và đều cho hoạt tính sinh học khi thử nghiệm in vitro và cả in vivo (Hou et al., 2011; Li, De-gang, Yong-jun, & Yi, 2008; Meng et al., 2011). Tuy nhiên, để sản xuất rChIFN- α với số lượng lớn và giá thành thấp phù hợp cho chăn nuôi thì phải cân nhắc các hệ thống biểu hiện. Trong số đó, nấm men *pichia pastoris* là một ứng viên đầy tiềm năng, nó đã được sử dụng để biểu hiện IFN- α của nhiều loài như heo (Yu et al., 2010), bò (Iglesias-Figueroa et al., 2016), trâu (Tyagi

et al., 2017), lạc đà (Wang, Wang, Li, Guo, & Liu, 2015), người (Ghosalkar, Sahai, & Srivastava, 2008; Sams et al., 2017) với sản lượng cao, và IFN- α có hoạt tính sinh học tốt. Ngoài ra, *pichia pastoris* có thể biểu hiện protein với hàm lượng từ miligram tới gram cả trong nghiên cứu phòng thí nghiệm lẫn trong sản xuất quy mô công nghiệp (Macauley-Patrick, Fazenda, McNeil, & Harvey, 2005) và thành phần môi trường nuôi cấy đơn giản, chi phí lên men thấp, các phương pháp sử dụng được thương mại hóa, chủng và các vector biểu hiện có sẵn trên thị trường (Invitrogen) (Zhang, Inan, & Meagher, 2000). Do vậy, có thể thấy, *pichia pastoris* là ứng viên biểu hiện protein tiềm năng nhất hiện nay. Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã nghiên cứu tạo ra rChIFN- α biểu hiện trên hệ thống tế bào nấm men *pichia pastoris* (Vo, Nguyen, Nguyen, & Nguyen, 2014). Do vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu **khả năng ức chế virus gây bệnh Gumboro trên gà 3 tuần tuổi nhằm, làm cơ sở** tiến hành các nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng nhiều loại virus khác gây bệnh trên gia cầm.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Nguyên vật liệu

Gà giống Tam Hoàng 1 ngày tuổi được nuôi lớn đến 3 tuần tuổi. Gà được kiểm tra kháng thể thụ động kháng virus Gumboro, dựa trên khả năng hình thành kết tủa giữa kháng thể trong máu gà thí nghiệm và kháng nguyên - virus Gumboro trong vaccine, khi đạt 3 tuần tuổi. Tất cả gà cho kết quả âm tính khi thực hiện phản ứng kết tủa khuếch tán trên thạch (AGP-Agarose Gel Precipitation) sẽ được sử dụng làm thí nghiệm.

Virus Gumboro độc lực cao (bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Đại học Cần Thơ).

Dịch rChIFN- α (Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh).

Kháng nguyên và kháng thể chuẩn kháng virus Gumboro (CSIRO, Australia).

Bộ kit FlockCheck IBD-XR (IDEXX Laboratories, USA).

Agarose và các sinh phẩm cần thiết dùng trong phản ứng AGP.

Trứng gà có phôi 10 ngày tuổi không có kháng thể kháng Gumboro (dùng thí nghiệm tính liều gây chết 50% phôi -ELD₅₀: embryo lethal dose 50%).

2.2. Phương pháp thí nghiệm

2.2.1. Chuẩn bị dịch virus Gumboro và xác định liều ELD₅₀

Virus gây bệnh Gumboro được thu nhận từ các mẫu bệnh phẩm (bộ môn Thú Y, khoa Nông nghiệp Đại học Cần Thơ). Dịch virus này được gây nhiễm trên phôi gà 10 ngày tuổi, với nồng độ theo lg từ 10⁻¹ đến 10⁻⁸, được tiêm vào màng nhũ nang của phôi, mỗi phôi được tiêm 0,1ml dịch virus và theo dõi sự phát triển phôi sau mỗi 24 giờ tiêm virus cho đến tối đa 140 giờ (5 ngày) sau tiêm. Mỗi khi phôi chết, tiến hành thu dịch niệu và kiểm tra sự hiện diện của virus dựa trên phản ứng khuếch tán trên thạch với kháng thể chuẩn kháng virus Gumboro. Cách tính liều ELD₅₀ (50% embryo lethal dose - liều gây chết 50% phôi thử nghiệm) dựa vào phương pháp của Reed và Muench (1938).

2.2.2. Xác định độc lực của virus Gumboro trên gà thí nghiệm

Gà thí nghiệm thức virus và nhóm đối chứng. Nhóm thí nghiệm thức virus, mỗi gà được nhỏ mắt/mũi với 0,2ml dịch virus gumboro chứa 5×10^4 ELD₅₀; nhóm đối chứng gà được nhỏ mắt/mũi với 0,2ml dung dịch PBS (phosphate buffered saline). Sau khi xử lý với virus, gà được theo dõi mỗi ngày, quan sát triệu chứng bệnh, ghi nhận số gà bệnh, chết, và mổ khám gà chết để

kiểm tra bệnh tích. Thí nghiệm được thực hiện lặp lại 03 lần (tổng số 15 gà/ thí nghiệm thức). Sau 07 ngày lây nhiễm virus, những gà sống được thu huyết thanh để thực hiện phản ứng kết tủa khuếch tán trong thạch (agar gel precipitation, APG). Tất cả các gà trong thí nghiệm được chăm sóc trong cùng điều kiện). Lưu ý, gà thí nghiệm ở mỗi lô được nuôi cách biệt tránh sự lây nhiễm giữa gà ở thí nghiệm thức đối chứng và thí nghiệm thức gây nhiễm virus.

2.2.3. Xác định khả năng kháng virus Gumboro của rChIFN- α trong điều kiện in vivo

Gà 3 tuần tuổi, không có kháng thể kháng Gumboro, được chia làm 6 nhóm ngẫu nhiên, tổng gà 03 lần thí nghiệm ở mỗi nhóm là 30 con (Bảng 1). Các nhóm thí nghiệm gồm: 04 nhóm điều trị sử dụng rChIFN- α với các nồng độ 0,1 $\mu\text{g/con}$, 1 $\mu\text{g/con}$, 10 $\mu\text{g/con}$ hoặc 100 $\mu\text{g/con}$; nhóm đối chứng nhiễm virus không được điều trị (ĐC (+)); nhóm đối chứng gà khỏe mạnh, không nhiễm virus, không sử dụng rChIFN- α (ĐC (-)). Mỗi gà trong nhóm điều trị và ĐC (+) được lây nhiễm với 0,2ml dịch virus Gumboro liều $5 \times 10^4 \text{ ELD}_{50}$ bằng cách nhỏ mắt/mũi; sau 24 giờ gây nhiễm virus, mỗi gà được điều trị bằng cách nhỏ mắt/mũi với 1 liều rChIFN- α ở nồng độ khác nhau phụ thuộc vào nhóm thí nghiệm. Trong thời gian thí nghiệm 3 tuần (bắt đầu tính từ ngày gà được lây nhiễm virus), ghi nhận số gà bệnh, chết; những gà chết được tiến hành mổ khám, ghi nhận bệnh tích và thu lấy mẫu bệnh phẩm (túi Fabricius, tuyến ức, lách, gan) để kiểm tra virus Gumboro. Gà được lấy máu ở mỗi đầu tuần thí nghiệm để kiểm tra hiệu giá kháng thể.

Bảng 1

Bố trí thử nghiệm xác định hiệu quả của rChIFN- α trong điều trị bệnh Gumboro

STT	Số lượng	Nhóm	Số liệu	Virus	Đường cấp
1	30	rChIFN- α 0,1 $\mu\text{g/con}$	1	+	Mắt/ mũi
2	30	rChIFN- α 1 $\mu\text{g/con}$	1	+	Mắt/ mũi
3	30	rChIFN- α 10 $\mu\text{g/con}$	1	+	Mắt/ mũi
4	30	rChIFN- α 100 $\mu\text{g/con}$	1	+	Mắt/ mũi
5	30	Đối chứng virus (ĐC(+))	-/ PBS	+	Mắt/ mũi
6	30	Đối chứng không tác động (ĐC(-))	-/ PBS	-	Mắt/ mũi

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Chỉ tiêu theo dõi:

$$\text{Tỉ lệ gà được bảo hộ (\%)} = [(\text{Số gà thí nghiệm} - \text{Số gà bệnh}) / \text{Số gà thí nghiệm}] \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Tỉ lệ gà chết (\%)} = (\text{Số gà chết} / \text{Số gà thí nghiệm}) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Tỉ lệ gà sống (\%)} = 100 - \text{tỉ lệ gà chết} \quad (3)$$

Hiệu giá kháng thể kháng Gumboro: $\log_{10} \text{hiệu giá} = 1,09(\log_{10} S/P) + 3,36$ (theo hướng dẫn của bộ kit phát hiện kháng thể kháng Gumboro, kit FlockCheck IBD-XR) (4)

S/P: là tỷ lệ dương tính của mẫu.

Chỉ số $S/P \leq 0,2$ 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).

Hiệu giá kháng thể ≥ 396 : mẫu huyết thanh dương tính với kháng thể kháng virus Gumboro.

2.3. Xử lý thống kê số liệu thực nghiệm

Tỉ lệ gà bệnh, tỉ lệ gà chết, tỉ lệ bảo hộ, tỉ lệ gà sống và hiệu giá kháng thể được xử lý bằng phép thử Chi - Square test trong chương trình stagraphic Centurion XV.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Chuẩn bị dịch virus Gumboro và xác định liều ELD₅₀

Sau mỗi 24 giờ tiêm dịch virus, soi kiểm tra phôi, các trứng có phôi chết được thu dịch niệu và biểu hiện của phôi chết được ghi nhận. Kết quả cho thấy, toàn bộ các phôi chết sau khi tiêm dịch virus đều có các biểu hiện như: phôi chết xuất huyết da đầu và chân, gan phôi xuất huyết, màng nhung niệu có những điểm xuất huyết. Khi nhiễm virus Gumboro, phôi chết sẽ có những biểu hiện như sung huyết, 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 (Graaf et al., 2018). Thêm nữa, dịch nước trứng thu từ các phôi chết đều cho kết quả tạo kết tủa khi thực hiện phản ứng AGP. Điều này chứng tỏ dịch virus Gumboro gây bệnh chết phôi với các bệnh tích điển hình.

Sau 5 ngày tiêm phôi, kết quả cho thấy nồng độ virus thấp nhất cho tỉ lệ phôi chết trên 50% và nồng độ virus cao nhất cho tỉ lệ phôi chết dưới 50% lần lượt là 10^{-4} và 10^{-5} , với tỉ lệ phôi chết tương ứng 70% và 44%. Dựa trên công thức của Reed và Muench (1938) tính được liều ELD₅₀/0,2ml là $10^{4,77}$, có nghĩa 0,2ml dịch virus ban đầu chứa $10^{4,77}$ liều gây chết 50% phôi.

3.2. Độc lực của virus Gumboro trên gà thí nghiệm

Sau 07 ngày thí nghiệm, kết quả ghi nhận tất cả gà (15 con) ở nhóm đối chứng đều khỏe mạnh, không có gà bệnh và không có gà chết. Các mẫu huyết thanh thu ở nhóm nghiệm thức này đều cho kết quả 100% không tạo kết tủa khi thực hiện phản ứng AGP. Ở nhóm virus, 100% gà trong nhóm đều biểu hiện bệnh sau ngày thứ 3-6 nhiễm virus; đồng thời 100% mẫu huyết thanh ở gà còn sống sau thí nghiệm (8/15) đều tạo kết tủa khi thực hiện phản ứng AGP và tỉ lệ gà chết lên đến 46,7% (7/15).

Gà nhiễm bệnh có các biểu hiện gà mệt, xù lông, bỏ ăn, thường dón về một góc; tiêu chảy và phân dính vào hậu môn, phân có màu trắng có niêm dịch, hoặc nhiều nước, đôi khi có lẫn máu; gà tự mổ vào hậu môn, da chân khô, gà nằm phủ phục, bỏ ăn, suy nhược và chết. Gà chết, mổ khám ghi nhận bệnh tích gồm túi fabrucius sung, xung huyết; xuất huyết cơ đòi, cơ ngực; xuất huyết giữa dạ dày cơ và dạ dày tuyến, thận sưng. Đây là các biểu hiện đặc trưng của bệnh tích do virus Gumboro gây ra (Dey, Pathak, Ramamurthy, Maity, & Chellappa, 2019; Le, 2004; Teshome, Fentahunand, & Admassu, 2015). Các kết quả này phù hợp với nhận định của Marcus và Hou, các tác giả cho rằng gà rất cảm nhiễm với virus ở giai đoạn 3-6 tuần tuổi, tỉ lệ chết có thể 40-60% (Hou et al., 2011; Marcus, Heide, & Sekellick, 1999). Điều này khẳng định chủng virus sử dụng trong thí nghiệm là chủng virus Gumboro độc lực cao.

3.3. Khả năng kháng virus Gumboro của rChIFN- α trên gà 3 tuần tuổi

Sau khi nhiễm virus, gà thí nghiệm có biểu hiện bệnh và chết sau 3-7 ngày. Khả năng kháng virus Gumboro của rChIFN- α được thể hiện qua lượng gà bệnh và chết, được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2

Tỉ lệ gà sống chết sau 7 ngày bị gây nhiễm virus

Nhóm	Số lượng	Gà bệnh		Gà chết		Gà khỏe/sống	
		Số lượng (con)	Tỉ lệ (%)	Số lượng (con)	Tỉ lệ (%)	Tỉ lệ bảo hộ (%)	Tỉ lệ sống (%)
rChIFN- α 0,1 μ g/con	30	16	53,33 ^a	6	20 ^a	46,67 ^a	80,0 ^a
rChIFN- α 1 μ g/con	30	12	40,0 ^b	4	13,33 ^{ab}	60,0 ^b	86,67 ^{ab}
rChIFN- α 10 μ g/con	30	10	33,33 ^b	2	6,67 ^{bc}	66,67 ^b	93,33 ^{bc}
rChIFN- α 100 μ g/con	30	10	33,33 ^b	2	6,67 ^{bc}	66,67 ^b	93,33 ^{bc}
ĐC(+)	30	30	100 ^c	12	40,0 ^d	0 ^c	60,0 ^d
ĐC(-)	30	0	0 ^d	0	0 ^c	100 ^d	100 ^c

Các số trong cùng một cột mang những chữ số mũ khác nhau thì sai khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

ĐC (+): đối chứng dương (gà gây nhiễm với virus Gumboro nhưng không được điều trị bằng rChIFN- α)

ĐC (-): đối chứng âm (gà không gây nhiễm với virus Gumboro và không điều trị bằng rChIFN- α)

Nguồn: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

Kết quả Bảng 2 cho thấy, toàn bộ gà ở nhóm ĐC (+) bị nhiễm bệnh (tỉ lệ bảo hộ 0%), và và chết (tỉ lệ chết lên đến 40%), đây là nhóm có tỉ lệ bệnh và chết cao nhất, có khác biệt với nhóm ĐC (-) và các nhóm còn lại. Nhóm ĐC (-) gà không bị ảnh hưởng (tỉ lệ bảo hộ đạt 100%). Trong khi đó, các nhóm nghiệm thức có sử dụng rChIFN- α , hàm lượng 0,1 μ g – 100 μ g/con có tỉ lệ gà bệnh, chết và tỉ lệ bảo hộ dao động tương ứng là 33,33% - 53,33%; 6,67% - 20% và 46,67% - 66,67%, các tỉ lệ này phụ thuộc nồng độ rChIFN- α sử dụng.

Trong các nhóm sử dụng rChIFN- α , kết quả ghi nhận cụ thể: nhóm sử dụng rChIFN- α 0,1 μ g/con có tỉ lệ gà bệnh, chết tương ứng 53,33% và 20%, tỉ lệ này là cao nhất so với các nhóm còn lại, có sự khác biệt khi xử lý thống kê. Nhóm sử dụng rChIFN- α 1 μ g/con có tỉ lệ gà bệnh, chết tương ứng 40,0% và 13,33%. Hai nhóm sử dụng rChIFN- α 10 μ g/con và 100 μ g/con có kết quả điều trị giống nhau, tỉ lệ gà bệnh và chết tương ứng 33,33% và 6,67%, thấp nhất so với các nhóm còn lại.

Hình 1. Hiệu quả kháng virus gây bệnh Gumboro của rChIFN- α

Khả năng kháng của rChIFN- α thể hiện rõ ở tỉ lệ gà được bảo hộ và tỉ lệ gà sống. Kết quả cho thấy tỉ lệ gà bảo hộ ở các nhóm sử dụng rChIFN- α hàm lượng 0,1 μg - 100 $\mu\text{g}/\text{con}$ dao động từ 46,67% - 66,67%, tương ứng (Hình 1). Trong khi đó, nhóm ĐC (+), gà không được bảo hộ (0%) và khác biệt có ý nghĩa so với các nhóm được điều trị ($P=0,001$). Tương tự, tỉ lệ gà sống ở các nhóm sử dụng rChIFN- α dao động 80 - 93,3%, và cao hơn so với nhóm đối chứng ĐC (+) (60%). Hai nhóm sử dụng rChIFN- α 100 $\mu\text{g}/\text{con}$ và 10 $\mu\text{g}/\text{con}$, có tác dụng điều trị như nhau. Kết quả thí nghiệm cho thấy sử dụng rChIFN- α với liều 10 $\mu\text{g}/\text{con}$ đạt hiệu quả cao nhất, hạn chế tỷ lệ bệnh và chết trong điều trị bệnh Gumboro hơn so với các liều khác. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nhận định của Marcus và cộng sự (1999), Hou và cộng sự (2011), Meng và cộng sự (2011).

Lí thuyết đã chứng minh ChIFN- α có hiệu quả trong điều trị bệnh Gumboro bằng cách cản trở sự tổng hợp RNA và protein của virus, giúp ngăn cản sự xâm nhiễm của virus vào tế bào mới. Trên thực tế, đã có nhiều nghiên cứu chứng minh ChIFN- α là tác nhân chống virus đầy tiềm năng, có hoạt tính cảm ứng promotor Mx cao (Schultz, Köck, Schlicht, & Staeheli, 1995), và có tác dụng làm giảm tình trạng nhiễm virus Newcastle khi cho uống với liều cao (Marcus et al., 1999), có khả năng phòng và trị nhiều bệnh do virus khác trên gia cầm như bệnh cúm gia cầm do virus cúm H9N2 (Meng et al., 2011), virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm (Pei, Sekellick, Marcus, Choi, & Collisson, 2001), ức chế sự tăng sinh khối u do Rous sarcoma virus (Plachý et al., 1999), có tác dụng phòng bệnh khá tốt đối với bệnh Gumboro và Newcastle trên gà thương phẩm (Mo, Cao, & Lim, 2001).

Tần suất biểu hiện bệnh trên gà thí nghiệm

Trong thí nghiệm, có 78/180 gà thí nghiệm có các biểu hiện triệu chứng bệnh khi bị nhiễm virus Gumboro. Tần suất biểu hiện các triệu chứng được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3

Các triệu chứng trên gà mắc bệnh

Triệu chứng	Tần suất xuất hiện triệu chứng bệnh trên gà thí nghiệm	
	Số lượng (con)	Tỷ lệ (%)
Tiêu chảy phân trắng nhiều nước, hậu môn dính đầy phân	78	100,00
Gà ủ rũ, xù lông (nằm phủ phục)	72	92,31
Da chân khô	62	79,49
Gục đầu vào cánh	35	44,87
Tự mổ vào hậu môn	24	30,77

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Tần suất xuất hiện bệnh tích trên gà chết

Trong thí nghiệm, có 26/180 gà thí nghiệm chết, gà chết được mổ khám ghi nhận biểu hiện bệnh tích do virus Gumboro. Tần suất xuất hiện bệnh tích trên gà chết được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4

Tần suất xuất hiện bệnh tích trên gà chết trong thí nghiệm (n=13)

Bệnh tích	Tần suất xuất hiện triệu chứng bệnh trên gà thí nghiệm	
	Số lượng (con)	Tỷ lệ (%)
Túi Fabricius thay đổi (sung, xuất huyết)	26	100,00
Xuất huyết cơ đùi, cơ ngực	26	100,00
Xuất huyết giữa dạ dày cơ và dạ dày tuyến	24	92,31
Thận sung	18	69,23
Tuyến ức có điểm hoặc mảng xuất huyết	12	46,15

Nguồn: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

Kết quả ghi tần suất xuất hiện bệnh và bệnh tích cho thấy: gà trong thí nghiệm có nhiều biểu hiện triệu chứng bệnh do virus Gumboro gây ra. Gần như toàn bộ gà đều bị tiêu chảy phân trắng, hậu môn dính đầy phân và gà ủ rũ, nằm phủ phục. Các triệu chứng này hoàn toàn phù hợp với nhận định của tác giả Hồ Thị Việt Thu (2012) về triệu chứng gà bị bệnh Gumboro. Toàn bộ gà chết đều có biểu hiện bệnh tích sung, xuất huyết túi Fabricius và bệnh tích xuất huyết cơ đùi, cơ ngực (100%). Biểu hiện bệnh tích này giống với miêu tả của Le (2004), Mo và cộng sự (2011), Bui (2003). Ngoài ra, gà chết cũng có các biểu hiện bệnh tích xuất huyết giữa dạ dày cơ và dạ dày tuyến, thận sung và tuyến ức cũng có mảng xuất huyết. **Các kết quả này** cho thấy gà có các biểu hiện triệu chứng và bệnh tích điển hình chủ yếu tập trung ở các cơ quan miễn dịch và hệ cơ.

Hiệu giá kháng thể của gà trước và sau khi khi gây nhiễm virus Gumboro

Hình 2. Biểu đồ kháng thể của gà trong thí nghiệm

Kết quả hiệu giá kháng thể của gà thí nghiệm (Hình 2) cho thấy: sau khi gà được gây nhiễm virus Gumboro, ĐC (+), 100% gà đều có đáp ứng miễn dịch với virus; trong khi đó nhóm đối

chứng âm - gà không được gây nhiễm virus, hoàn toàn không có đáp ứng miễn dịch, hiệu giá kháng thể không tăng sau 3 tuần thử nghiệm.

Ở các nhóm có tiếp xúc với virus, kể cả đối chứng dương, hiệu giá kháng thể tăng mạnh sau 1 tuần gây nhiễm với virus Gumboro, lượng kháng thể của gà tăng nhanh và đạt đỉnh; tiếp đó lượng kháng thể bắt đầu giảm ở tuần thứ 2 và thứ 3 nhưng vẫn cao. Đối với các nhóm xử lý với rChIFN- α , nhóm sử dụng rChIFN- α hàm lượng cao thì kháng thể tạo ra cao hơn nhóm sử dụng rChIFN- α hàm lượng thấp, và thấp hơn của ĐC (+). Khi xử lý thống kê, lượng kháng thể của các nhóm sử dụng rChIFN- α và ĐC (+) không có khác biệt ở mọi thời điểm đánh giá, tuy nhiên lại khác biệt có ý nghĩa so với ĐC (-). Điều này cho thấy, khả năng kháng virus của rChIFN- α hoàn toàn không gây ảnh hưởng đến khả năng đáp ứng miễn dịch của gà khi nhiễm virus. Do vậy, rChIFN- α có thể mang đến triển vọng sử dụng như một tá dược trong vaccine, giúp động vật có sự bảo hộ nhanh trước khi có miễn dịch lâu dài do vaccine.

4. Kết luận và đề nghị

Nghiên cứu bước đầu cho thấy, khi gà đã nhiễm virus, sử dụng rChIFN- α điều trị thì tỉ lệ bảo hộ dao động 46,67% - 67,67% và tỉ lệ gà sống đạt 80,0% - 93,33% tùy thuộc liều sử dụng. rChIFN- α khi sử dụng liều 10 $\mu\text{g}/\text{con}$ tỉ lệ bảo hộ hơn 83%, tỉ lệ sống hơn 90% và không gây ảnh hưởng đến đáp ứng miễn dịch của gà. Do vậy, rChIFN- α có khả năng kháng virus Gumboro, có thể sử dụng điều trị bệnh Gumboro. Triển vọng tương lai, khi có dịch bệnh xảy ra, rChIFN- α sẽ là tác nhân tích cực giúp điều trị và khu trú ổ dịch. Tuy nhiên cũng rất cần thiết phải thực hiện nhiều nghiên cứu với quy mô lớn trên nhiều loại virus gây bệnh gia cầm.

LỜI CẢM ƠN

PGS.TS Hồ Thị Việt Thu, ThS. Trần Khánh Long đã tận tình hỗ trợ nhóm nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

- Bui, L. D. (2003). *Nuôi gà thịt (Broiler) công nghiệp và lông màu thả vườn năng suất cao [Industrial broiler and backyard color feathering free ranger has high yield]*. Hanoi, Vietnam: NXB Nông nghiệp Hà Nội.
- Dey, S., Pathak, D. C., Ramamurthy, N., Maity, H. K., & Chellappa, M. M. (2019). Infectious bursal disease virus in chickens: Prevalence, impact, and management strategies. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 10, 85-97. doi:10.2147/VMRR.S185159
- Ghosalkar, A., Sahai, V., & Srivastava, A. (2008). Secretory expression of interferon-alpha 2b in recombinant *Pichia pastoris* using three different secretion signals. *Protein Expression and Purification*, 60(2), 103-109. doi:10.1016/j.pep.2008.02.006
- Graaf, A., Ulrich, R., Maksimov, P., Scheibner, D., Koethe, S., Abdelwhab, E. M., ...Harder, T. (2018). A viral race for primacy: Co-infection of a natural pair of low and highly pathogenic H7N7 avian influenza viruses in chickens and embryonated chicken eggs. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 1-12. doi:10.1038/s41426-018-0204-0
- Hou, F., Liu, K., Shen, T., Zhou, B., Cao, R., Li, P., & Chen, P. (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), 73-79. doi:10.1016/j.rvsc.2010.11.015

- Iglesias-Figueroa, B., Valdiviezo-Godina, N., Siqueiros-Cendón, T., Sinagawa-García, S., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. (2016). High-level expression of recombinant bovine lactoferrin in *pichia pastoris* with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 902. doi:10.3390/ijms17060902
- Le, N. V. (2004). *Bệnh Gumboro ở gà và biện pháp phòng trị [Gumboro disease in chickens and preventive measures]*. Hanoi, Vietnam: NXB Nông Nghiệp Hà Nội.
- Li, S., De-gang, Z., Yong-jun, W., & Yi, L. (2008). Transient expression of chicken alpha interferon gene in lettuce. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 9(5), 351-355. doi:10.1631/jzus.B0710596
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249-270. doi:10.1002/yea.1208
- Marcus, P. I., Heide, L. V. D., & Sekellick, M. J. (1999). Interferon action on avian viruses. I. Oral administration of chicken interferon-alpha ameliorates Newcastle disease. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 19(8), 881-885. doi:10.1089/107999099313406
- Meng, S., Yang, L., Xu, C., Qin, Z., Xu, H., Wang, Y., ...Liu, W. (2011). Recombinant chicken interferon- α inhibits H9N2 avian influenza virus replication in vivo by oral administration. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(7), 533-538. doi:10.1089/jir.2010.0123
- Mo, C. W., Cao, Y. C., & Lim, B. L. (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, 389-399.
- Pei, J., Sekellick, M. J., Marcus, P. I., Choi, I. S., & Collisson, E. W. (2001). Chicken interferon type I inhibits infectious bronchitis virus replication and associated respiratory illness. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 21(12), 1071-1077. doi:10.1089/107999001317205204
- Pham, L. S., & Nguyen, T. (2004). *Một số bệnh mới do virus ở gia súc, gia cầm nhập nội và biện pháp phòng trị [New diseases caused by virus in imported cattle and poultry and preventive measures]*. Hanoi, Vietnam: NXB NN Hà Nội.
- Plachý, J., Weining, K. C., Kremmer, E., Puehler, F., Hala, K., Kaspers, B., & Staeheli, P. (1999). Protective effects of type I and type II interferons toward Rous sarcoma virus-induced tumors in chickens. *Virology*, 256(1), 85-91. doi:10.1006/viro.1999.9602
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method for estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493-497. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
- Sams, L., Amara, S., Chakroun, A., Coudre, S., Paume, J., Giallo, J., & Carrière, F. (2017). Constitutive expression of human gastric lipase in *Pichia pastoris* and site-directed mutagenesis of key lid-stabilizing residues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(10), 1025-1034. doi:10.1016/j.bbalip.2017.07.002
- Schultz, U., Köck, J., Schlicht, H. J., & Staeheli, P. (1995). Recombinant duck interferon: A new reagent for studying the mode of interferon action against hepatitis B virus. *Virology*, 212(2), 641-649. doi:10.1006/viro.1995.1522

- Teshome, M., Fentahunand, T., & Admassu, B. (2015). Infectious bursal disease (Gumboro disease) in Chickens. *British Journal of Poultry Sciences*, 4(1), 22-28. doi:10.5829/idosi.bjps.2015.4.1.95172
- Tizard, I. R. (2004). *Cytokines and the immune system. Veterinary immunology - An introduction* (7th ed.). New York, NY: Elsevier.
- Vo, T. T. M., Nguyen, G. T. T., Nguyen, Q. D., & Nguyen, B. Q. (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* [Cloning, expression and bioactivity determination of recombinant chicken interferon obtained from the *Pichia pastoris* yeast system]. *Tạp chí Sinh học*, 36(1), 216-225.
- Wang, N., Wang, K. Y., Li, G., Guo, W., & Liu, D. (2015). Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 111, 75-81. doi:10.1016/j.pep.2015.03.012
- Yu, R., Dong, S., Zhu, Y., Jin, H., Gao, M., Duan, Z., ...Li, Z. (2010). Effective and stable porcine interferon- α production by *Pichia pastoris* fed-batch cultivation with multi-variables clustering and analysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(4), 473-483.
- Zhang, W., Inan, M., & Meagher, M. M. (2000). Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5(4), 275-287.