



MỤC LỤC**NGHIÊN CỨU KHOA HỌC**

- NGUYỄN VĂN CƯỜNG, NGUYỄN MINH LUÂN, NGÔ THỊ NGỌC TRÂM, BÙI THỊ TÔ
NGA, ĐỖ TIẾN DUY
Một số đặc điểm truyền lây và bệnh lý rối loạn sinh sản ở đàn heo nái nhiễm virus bệnh tử não châu
Phi độc lực thấp 1
- ĐẶNG ANH VIỆT, PHẠM THÁI BÌNH, TRẦN TOÀN, NGUYỄN THỊ BÍCH THƯƠNG, NGUYỄN
THỊ MỸ TRINH, NGUYỄN XUÂN HÒA, HUỖNH THỊ KIM LOAN, TRẦN THỊ LỢI, NGÔ
QUỐC CƯỜNG
Nghiên cứu tạo chế phẩm kháng thể IgY kháng virus tembusu gây hội chứng giảm đẻ trên vịt 12
- BÙI THỊ TUYẾT TRINH, LÊ VINH NGUYỄN HÂN, THÁI QUỐC HIẾU, NGUYỄN LÝ
PHƯƠNG VY, NGUYỄN NGỌC CHÂU, NGUYỄN KHÁNH THUẬN
Sự hiện diện của virus parainfluenza-3 và caprine arthritis-encephalitis trên đường hô hấp của dê
tại thành phố Cần Thơ 23
- VŨ THỊ THU TRÀ, VŨ THỊ HIỀN, BÙI ĐỨC TOÀN, CHU THỊ THANH HƯƠNG, BÙI TRẦN
ANH ĐÀO, TRẦN THỊ HƯƠNG GIANG
Phân lập và xác định mức độ mẫn cảm với kháng sinh của vi khuẩn *Escherichia coli* trên bò sữa tại
huyện Gia Lâm, TP. Hà Nội 30
- NGUYỄN THỊ THU HẰNG, TRƯƠNG QUỲNH NHƯ
Xác định mầm bệnh vi khuẩn trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bị bệnh xuất huyết thối cơ thịt 37
- NGUYỄN THỊ BÍCH THỦY, LƯU THỊ HẢI YẾN, NGUYỄN XUÂN HUYỀN, TRẦN VIỆT
DŨNG KIÊN, ĐẶNG PHƯƠNG ANH, LÊ THỊ MINH HẰNG, VĂN THỊ HƯƠNG, ĐÀO THỊ
TOÀN, NGUYỄN CÔNG DÂN, PHÙNG QUỐC CHUÔNG
Nghiên cứu một số đặc tính sinh học của vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* phân lập từ cá rô phi nuôi
tại một số tỉnh miền Bắc 41
- DƯƠNG NHƯ NGỌC, PHẠM NGỌC DUẬN, TRƯƠNG THỊ QUỲ DƯƠNG, NGUYỄN THỊ
LAN ANH, NGUYỄN THỊ BÍCH THỦY, SÁNDOR HORNOK, RÓBERT FARKAS, ĐÀO THỊ
HÀ THANH
Chẩn đoán phát hiện và định danh sinh học phân tử đối với đơn bào ký sinh đường máu (*Theileria*
spp.) trên động vật nhai lại (trâu, bò, dê) và ngựa tại miền Bắc Việt Nam 5
- PHẠM ĐIỀU THỦY, DƯƠNG THỊ HỒNG DUYÊN, TRẦN NHẬT THẮNG, NGUYỄN THỊ
NGÂN, NGUYỄN HỮU HÒA
Tình hình nhiễm mô đờ trên đàn gà nhiều ngón nuôi thả vườn tại Trường Đại học Nông Lâm Thái
Nguyên, sử dụng nước chiết sả, mần tưới điều trị
- NGÔ VÔ KỶ DUYÊN, TRẦN THỊ QUỲNH LAN
Đánh giá khả năng sử dụng đĩa (*Hirudo medicinalis*) trong lấy máu không xâm lấn trên thỏ thí nghiệm

NÂNG CAO - THAM KHẢO

- TÓNG THỊ THU HOA, TÓNG THỊ MỸ HẠNH
Các bệnh do virus lây từ động vật sang người mới nổi và tái nổi ở Đông Nam Á: sự cần thiết của
chiến lược Một sức khỏe

TRAO ĐỔI KHKT - HOẠT ĐỘNG NGÀNH

- CỤC THÚ Y
Tình hình kiểm dịch động vật, sản phẩm động vật và quản lý thuốc thú y 6 tháng đầu năm 2024
- THÂN TRỌNG TUYẾN
Hoạt động Hội Chăn nuôi Thú y Thừa Thiên - Huế 6 tháng đầu năm 2024

**KHOA HỌC KỸ THUẬT
THÚ Y**

JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE AND TECHNOLOGY

TẬP XXXI . SỐ 7 - 2024 VOL . XXXI . N°7 - 2024

HỘI THÚ Y VIỆT NAM
VIETNAM VETERINARY ASSOCIATION

NGHIÊN CỨU TẠO CHẾ PHẨM KHÁNG THỂ IgY KHÁNG VIRUS TEMBUSU GÂY HỘI CHỨNG GIẢM ĐẾ TRÊN VỊT

Đặng Anh Việt¹, Trà Toàn¹, Nguyễn Thị Bích Thương¹, Nguyễn Thị Mỹ Trinh², Phạm Thái Bình^{1,4}, Ngô Quốc Cường¹, Trần Thị Lợi¹, Huỳnh Thị Kim Loan¹, Nguyễn Xuân Hòa^{3*}

* Tác giả liên hệ email: nguyensexuanhoa@huaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm sản xuất kháng thể lòng đỏ trứng IgY đặc hiệu với virus Tembusu (TMUV) từ các gà mái được gây miễn dịch bằng đường tiêm các chủng TMUV bất hoạt được phân lập từ thực địa. Chủng virus TMUV-REP.V1.01.22 với liều gây chết 50% phôi vịt ELD₅₀ là 10^{-5.32} khi được bất hoạt hoàn toàn bằng Binary ethylenimine (BEI) 0,2%, ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Gà mái giống ISA Brown 20 tuần được sử dụng để gây tối miễn dịch và thu trứng sản xuất kháng thể với hiệu giá cao, khi tiêm kháng nguyên bất hoạt TMUV-REP.V1.01.22 với liều 10⁰ ELD₅₀, lặp lại 3 lần, mỗi lần cách nhau 2 tuần thì gà mái cho hiệu giá kháng thể TMUV đạt cao nhất (9,89 log₂), kéo dài và ổn định. Trung bình hiệu giá kháng thể IgY trong lòng đỏ trứng được thu từ gà mái gây miễn dịch với liều 10⁰ ELD₅₀, lặp lại 3 lần, sau khi tinh sạch có hiệu giá kháng thể TMUV đạt 7,63 log₂. Kháng thể lòng đỏ trứng IgY được tạo ra kháng lại virus Tembusu mở ra cơ hội trong phòng, chống bệnh Tembusu trên vịt.

Từ khóa: Tembusu virus, IgY tinh sạch

Research creating egg yolk antibodies (IgY) preparation against Tembusu virus causing acute egg drop syndrome in ducks

Dang Anh Viet, Tra Toan, Nguyen Thi Bích Thuong, Nguyen Thi My Trinh, Pham Thai Binh, Ngo Quoc Cuong, Tran Thi Loi, Huynh Thi Kim Loan, Nguyen Xuan Hoa*

SUMMARY

The study aimed to produce egg yolk antibodies (IgY) specific to Tembusu virus from hens immunized by injection with TMUV strains isolated from the field. Virus strain TMUV-REP.V1.01.22, with a 50% lethal dose for duck embryos (ELD₅₀) of 10^{-5.32}, was completely inactivated using 0.2% Binary Ethylenimine (BEI) at a temperature of 37°C for 24 hours. Twenty-week-old ISA Brown breeder hens were used to induce immunity and collect eggs that produced antibodies with high titers. The group of 20-week-old ISA Brown laying hens immunized 3 times with inactivated TMUV-REP.V1.01.22 strain at the dose of 10⁰ ELD₅₀ in a 2-week interval schedule showed the highest (9.89 log₂), longest-lasting, and most stable antibody titers. The average IgY antibody titer in egg yolks collected from immunized hens, after purification, reached 7.63 log₂ following the regimen of 10⁰ ELD₅₀ doses administered three times. IgY antibodies created by Tembusu viruses against open up opportunities in preventing and fighting Tembusu disease in ducks.

Keywords: Tembusu virus, IgY purification

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

¹ Công ty cổ phần Công nghệ Sinh học R.E.P

² Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

³ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

⁴ Đại Học Y Dược TP. HCM

Chăn nuôi chiếm một vai trò trọng yếu trong sản xuất nông nghiệp, trong đó chăn nuôi vịt siêu thịt và vịt đẻ đang là một hướng mới cho nhà chăn nuôi, theo thông kê của cục chăn nuôi vào cuối năm 2022, tổng đàn thủy cầm trên 103 triệu con chiếm 20% tổng đàn gia cầm trong cả nước. Sự phát triển nhanh chóng của ngành chăn nuôi thủy cầm dẫn đến nguy cơ sự bùng phát của nhiều loại dịch bệnh nguy hiểm như bệnh Tembusu, bệnh bại huyết, viêm gan do virus.

Bệnh do virus Tembusu (TMUV) gây ra lần đầu tiên bùng dịch vào năm 2010 ở Trung Quốc, đến tháng 03 năm 2019 các ca bệnh liên quan đến virus Tembusu lần đầu tiên được báo cáo ở Việt Nam (Đặng Hữu Anh và cs., 2020). Virus Tembusu được phân lập từ loài muỗi *Culex tritaeniorhynchus* tại Malaysia, thuộc chi *Flavivirus*, *Flaviviridae* (Zhang et al., 2017; Su et al., 2011). Bệnh do virus Tembusu gây ra là căn bệnh truyền nhiễm ở vịt, với các triệu chứng giảm đẻ đột ngột, giảm ăn, tiêu chảy phân xanh, chảy nước mũi, mất điều hòa hoạt động và bại liệt. Tỷ lệ mắc bệnh khoảng 90% và tỷ lệ chết từ 5% đến 30% (Cao et al., 2011).

Để ngăn chặn, khống chế dịch bệnh Tembusu, nhiều biện pháp đã được đề ra như sử dụng vaccine, tăng cường miễn dịch cho vật nuôi, tiêu độc khử trùng, diệt côn trùng, tuy nhiên theo xu hướng chăn nuôi sạch, hạn chế sử dụng kháng sinh, hóa chất trong chăn nuôi, tăng cường sử dụng các biện pháp sinh học, sử dụng kháng thể là liệu pháp tiềm năng trong phòng và điều trị bệnh. IgY là một kháng thể chủ yếu trong máu các loài chim, bò sát, cá có mang. Kháng thể IgY cũng được tìm thấy với hàm lượng cao trong lòng đỏ trứng gà. Giống như các loại kháng thể khác, kháng thể IgY là một lớp protein được hình thành với hệ miễn dịch khi phản ứng lại những yếu tố bên ngoài và đặc hiệu với các yếu tố đó. Kháng thể IgY đã được chứng minh mang lại hiệu quả điều trị gà khi gây bệnh thực nghiệm với virus Gumboro (Vũ Thị Thu Hằng và cs., 2019), vius Newcastle (Nguyễn Văn Tâm và cs., 2020), Ngoài ra, quy trình tạo chế phẩm kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng đơn giản, tiết kiệm chi phí và sản lượng cao, nên có thể làm giảm giá thành sản xuất của kháng thể.

Trước nhu cầu thực tiễn, nghiên cứu này được tiến hành nhằm sản xuất kháng thể lòng đỏ trứng IgY đặc hiệu với virus Tembusu từ các gà mái được gây miễn dịch bằng đường tiêm các chủng TMUV phân lập từ thực địa.

II. VẬT LIỆU NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Kháng nguyên TMUV: Chủng TMUV REP.V1.01.2022 phân lập từ mẫu vịt bệnh của vùng Đông Nam bộ Việt Nam, mã số genbank OQ451462 được bất hoạt bằng Binary ethylenimine (BEI) dùng làm kháng nguyên.

Tế bào: tế bào muỗi *Aedes albopictus* dòng C6/36 ATCC do viện Pasteur TP.HCM cung cấp được sử dụng để đánh giá kháng nguyên bất hoạt.

Trứng vịt đã có phôi 10-12 ngày tuổi.

Gà mái giống ISA Brown 20 tuần được sử dụng để gây miễn dịch và thu trứng sản xuất kháng thể.

Túi thẩm tích: Dialysis tubing cellulose membrane, Sigma-Aldrich, Code D9777.

Thiết bị: Tủ ấm 28°C, 37°C, tủ an toàn sinh học cấp 2, máy ly tâm và các thiết bị tại phòng Nghiên cứu và Phát triển sản phẩm, Trung tâm Phân Tích – Kiểm Nghiệm – Xét Nghiệm – Tầm Soát R.E.P, Công ty Cổ phần Công nghệ Sinh học R.E.P.

Dụng cụ: khay nhựa 96 giếng đáy chữ U, pipet một kênh 100, 200, 1000μL, pipet đa kênh 0-200μL, đầu type 10, 200, 1000μL, đèn soi trứng,...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn độ TMUV trên phôi vịt bằng phương pháp xác định liều gây chết 50% (ELD50: Embryo Lethal Dose)

Chuẩn bị phôi vịt 10-12 ngày tuổi: trứng vịt sạch được thu từ những đàn vịt khỏe mạnh, chưa được tiêm phòng vaccine TMUV. Trứng sau khi được thu gom và mang về phòng thí nghiệm được rửa sạch bằng nước cất, sau đó sát trùng bề mặt bằng ethanol 70° và áp trong tủ ẩm ở 37°C. Trứng được ấp sau 3-5 ngày, mỗi ngày tiến hành soi trứng bằng đèn soi trứng để loại bỏ những trứng hư, trứng không có phôi. Sau 10-12 ngày chọn 50 trứng có phôi khỏe mạnh dùng để gây nhiễm TMUV.

Nguyên tắc: Pha loãng huyền dịch virus bằng cách lấy 0,1mL dung dịch virus cho vào 0,9mL dung dịch PBS pH=7,2 để được nồng độ pha loãng 10^{-1} , tiếp tục pha loãng huyền dịch virus từ nồng độ 10^{-2} đến 10^{-9} . Mỗi nồng độ pha loãng được tiêm vào 5 trứng và tiến hành soi trứng mỗi ngày, loại bỏ những phôi chết trước 24 giờ, ghi nhận số phôi còn sống và số phôi đã chết ở mỗi nồng độ.

Cách tính liều ELD₅₀: Theo phương pháp của Reed and Muench (1938).

$$dp = (50 - L < 50\%) / (L > 50\% - L < 50\%)$$

$$Lg \text{ ELD}_{50} = Lg \text{ ELD} < 50\% + dp \times Lgf$$

Trong đó:

dp: Proportion dose.

L < 50%: Phần trăm tử số chết cận dưới 50%.

L > 50%: Phần trăm tử số chết cận trên 50%.

Lgf: $Lg 10 = 1$.

Bất hoạt chủng TMUV

Binary ethylenimine (BEI) được sử dụng để bất hoạt chủng TMUV. Chuẩn bị dung dịch gốc bằng BEA (2-bromoethylamine hydrobromide) 10% cách cân 2g BEA cho vào 20mL dung dịch NaOH 0,2N vô trùng. Khuấy tan và đun dung dịch BEA 10% trong bể cách thủy 37°C trong 2 giờ để quá trình chuyển hóa thành BEI. Dung dịch gốc cần chuẩn bị trước mỗi lần bất hoạt và bảo quản ở 4°C trong 1 tháng. Bỏ sung BEI 10% vào hỗn dịch virus TMUV để đạt nồng độ cuối cùng là 0,2% (Valero *et al.*, 2021). Thử nghiệm bất hoạt virus TMUV được thực hiện ở 4°C và 37°C trong 12, 24, 36 và 48 giờ. Sau khi thời gian ủ của mỗi thí nghiệm trung hòa lượng BEI khi kết thúc bất hoạt bằng sodium thiosulphate, nồng độ cuối cùng là 1%, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Mỗi nghiệm thức bất hoạt sẽ tiến hành nuôi cấy vào tế bào muỗi *Aedes albopictus* dòng C6/36 và tiêm vào 5 trứng vịt có phôi 10 ngày tuổi. Kháng nguyên TMUV được xác nhận là bất hoạt hoàn toàn khi không xuất hiện CPE và phôi vịt vẫn còn sống. PBS pH=7,2 được sử dụng làm đối chứng âm tính và chủng virus TMUV không bất hoạt được ủ ở 4°C và 37°C sau 48 giờ được sử dụng làm đối chứng dương tính.

Quy trình gây tối miễn dịch cho gà mái

Sử dụng 39 gà mái đẻ giống ISA-Brown, được chia thành 13 lô mỗi lô 3 con.

Đàn gà được chăm sóc nuôi dưỡng đảm bảo cung cấp đủ thức ăn, nước uống, được tiêm phòng một số dịch bệnh nguy hiểm như: Newcastle, Gumboro, cúm gia cầm,...

Kháng nguyên tiêm cho gà là:

+ Chủng TMUV bất hoạt phân lập từ vịt bệnh ở tỉnh Đồng Nai.

+ Vaccine TMUV Inactivated Strain HB (Vaccine).

Gà thí nghiệm được chia thành 4 lô mỗi lô thí nghiệm và 1 lô đối chứng được tiêm PBS, mỗi lô gồm 9 con gà. Mỗi lô gà mái được tiêm 3 con, mỗi con tiêm 1 liều lần lượt ở 3 nồng độ $10^{-1} \times \text{ELD}_{50}$, $10^0 \times \text{ELD}_{50}$, $10^1 \times \text{ELD}_{50}$ và Vaccine TMUV Inactivated Strain HB (2 vị trí bên ức trái và 2 vị trí bên ức phải của gà thí nghiệm), với số lần lặp lại ở mỗi nồng độ là 2, 3 và 4 lần tiêm nhắc lại, mỗi liều tiêm nhắc lại cách nhau 2 tuần. Liều tiêm 1mL/lần/gà (0,25mL/ 1 vị trí tiêm).

Gà sẽ được lấy máu và kiểm tra kháng thể hàng tuần sau mỗi lần tiêm. Trứng sẽ được thu hoạch hằng ngày, được đánh dấu ngày thu, nghiệm thức thí nghiệm và trữ ở 4°C không quá 7 ngày đến khi xử lý và tách chiết IgY.

Máu gà được lấy ở tĩnh mạch cánh, 2-3mL/ con và được ký hiệu theo từng lô riêng biệt. Máu lấy xong để yên trong ống nghiệm cho đông lại và bảo quản lạnh vận chuyển đến phòng thí nghiệm để chắc lấy huyết thanh.

Bảng 2.1. Bố trí thí nghiệm gây miễn dịch ở gà

Nghiệm thức	Số gà tiêm	Kháng nguyên	Nồng độ ELD₅₀	Thể tích tiêm (mL)	Đường tiêm	Số lần tiêm nhắc lại (lần)
NT1	3	Chủng TMUV phân lập	10 ⁻¹ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	2
NT2	3	Chủng TMUV phân lập	10 ⁻¹ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	3
NT3	3	Chủng TMUV phân lập	10 ⁻¹ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	4
NT4	3	Chủng TMUV phân lập	10 ⁰ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	2
NT5	3	Chủng TMUV phân lập	10 ⁰ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	3
NT6	3	Chủng TMUV phân lập	10 ⁰ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	4
NT7	3	Chủng TMUV phân lập	10 ¹ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	2
NT8	3	Chủng TMUV phân lập	10 ¹ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	3
NT9	3	Chủng TMUV phân lập	10 ¹ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	4
NT10	3	Vaxcin TMUV	-	1	Cơ ức	2
NT11	3	Vaxcin TMUV	-	1	Cơ ức	3
NT12	3	Vaxcin TMUV	-	1	Cơ ức	4
ĐC	3	PBS	-	1	Cơ ức	4

Phương pháp tách chiết và tinh sạch kháng thể từ lòng đỏ trứng

Kháng thể IgY được tách chiết từ lòng đỏ trứng và tinh sạch dựa theo mô tả của Ko và cộng sự năm 2007.

Chế nước trứng (WSF: Water-soluble fraction): Tách riêng lòng đỏ và lòng trắng của trứng. Lòng đỏ cho lên giấy Whatman No.1, Sau đó chọc thủng lớp bao cho lòng đỏ chảy vào trong cốc. Lòng đỏ trứng gà được pha loãng với nước cất để lạnh 4°C với tỷ lệ 1:9, điều chỉnh pH bằng HCL 1N về 5.0, Khuấy tan huyền dịch bằng máy khuấy từ ở 4°C, để lắng qua đêm ở 4°C. Thu phần dịch nổi bằng cách ly tâm 7000 vòng/ phút trong 20 phút ở 4°C, sau đó lọc phần dịch nổi qua giấy Whatman No.1. Dịch lọc thu được rửa với muối Ammonium sulfate (AS) ở 40% bão hòa, điều chỉnh pH bằng HCL 1N về 5.0, mỗi phân đoạn rửa được ủ ở 4 °C, trong 2 giờ, sau đó ly tâm lần 1 với 4000 vòng trong 30 phút bỏ phần nước nổi (dùng để rửa lần 2) giữ lại phần cặn rửa. Phần nước nổi được tiếp tục rửa lần 2 với muối AS ở 40% bão hòa, điều chỉnh pH bằng HCL 1N về 5.0, ủ ở 4°C, trong 2 giờ, sau đó ly tâm lần 1 với 4000 vòng trong 30 phút bỏ phần nước nổi thu phần cặn rửa. Phần rửa của 2 lần được hòa tan trong dung dịch đệm phosphate pH=7.2. Sau đó tiến hành thẩm tích để loại bỏ muối.

Xác định hiệu giá kháng thể kháng IgY bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA)

Tất cả các mẫu kháng thể sau khi tinh sạch được xác định hàm lượng kháng thể bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu (HI). Thực hiện phản ứng HI theo mô tả của Đặng Anh Việt và cộng sự năm 2023. Sử dụng bảng nhựa 96 giếng đáy chữ U theo hàng 12 giếng. Cho 25µL dung dịch borat pH=9 vào bảng nhựa 96 giếng đáy chữ U theo hàng 12 giếng. Cho 25µL mẫu kháng thể IgY vào giếng đầu tiên. Dùng pipet pha loãng bậc hai đến giếng 12. Cho 25µL kháng nguyên 8 đơn vị ngưng kết hồng cầu vào các giếng. Để tiếp xúc tối

thiếu 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Cho 50 μ L dung dịch hồng cầu nồng độ 0,33% có pH=6,0 vào tất cả các giếng, lắc nhẹ, để băng nhựa ở nhiệt độ phòng. Đọc kết quả sau 30 phút. Đồng thời làm các giếng đối chứng mẫu kháng thể IgY, đối chứng kháng nguyên có hiệu giá đã chuẩn độ, đối chứng hồng cầu nồng độ 0,33%. Đọc kết quả các giếng (+) khi hồng cầu lắng tụ, (-) khi hồng cầu ngưng kết. Hiệu giá virus là độ pha loãng cuối cùng có khả năng làm ngưng kết hồng cầu và được tính là 1 đơn vị ngưng kết.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được tổng hợp, xử lý và phân tích sơ bộ ban đầu bằng MS. Excel 2018, sau đó được phân tích sâu bằng phần mềm Minitab 18. Nghiên cứu này sử dụng phương pháp thống kê mô tả thông qua giá trị trung bình. Ngoài ra, nghiên cứu này còn sử dụng kiểm định ANOVA để kiểm định sự khác biệt giá trị trung bình giữa các yếu tố ảnh hưởng. Trong đó, Các giá trị trung bình mang cùng một chữ cái thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định liều gây chết 50% phôi trứng (ELD₅₀) của chủng virus TMUV (REP.V1.01.22)

Trứng đã tiêm được quan sát hàng ngày ghi nhận số trứng có phôi bị chết và số phôi sống. Phôi chết có bệnh tích điển hình của bệnh TMUV như xuất huyết toàn thân, não phù nề (Hình 3.1. B và C). Kết quả chi tiết thể hiện ở Bảng 3.1

Bảng 3.1. Kết quả chuẩn độ liều gây chết 50% phôi trứng (ELD₅₀) của virus Tembusu (REP.V1.01.22)

Nồng độ virus pha loãng	Số phôi được tiêm	Số thí nghiệm		Số tích lũy		Số phôi chết / tổng số	Tỷ lệ chết (%)
		Phôi sống	Phôi chết	Phôi sống	Phôi chết		
10 ⁻¹	5	0	5	0	24	24/24	100,00
10 ⁻²	5	0	5	0	19	19/19	100,00
10 ⁻³	5	0	5	0	14	14/14	100,00
10 ⁻⁴	5	0	5	0	9	9/9	100,00
10 ⁻⁵	5	2	3	2	4	4/6	66,66
10 ⁻⁶	5	4	1	6	1	1/7	14,24
10 ⁻⁷	5	5	0	11	0	0/11	0,00
10 ⁻⁸	5	5	0	16	0	0/16	0,00
10 ⁻⁹	5	5	0	21	0	0/21	0,00
10 ⁻¹⁰	5	5	0	26	0	0/26	0,00

Bảng 3.1 cho thấy, ở độ pha loãng 10⁻⁵ đạt được nồng độ virus thấp nhất gây chết trên 50% phôi và độ pha loãng 10⁻⁶ đạt được nồng độ virus cao nhất gây chết dưới 50% phôi với tỷ lệ tương ứng là 66,66% và 14,24%. Dựa vào tỷ lệ sống chết của phôi để tính toán liều ELD₅₀ theo công thức Reed & Muench (1938), kết quả tính toán được thể hiện theo công thức bên dưới:

Khoảng cách tỷ lệ dp giữa 2 độ pha loãng 10^{-5} và 10^{-6} :

$$dp = \frac{50 - L < 50\%}{L > 50\% - L < 50\%} = \frac{50 - 14,24}{66,66 - 14,24} = 0,68$$

Log độ pha loãng gây chết 50% là:

$$\text{Log ELD}_{50} = \text{Log ELD} < 50\% + dp \times \text{Lgf} = -6 + 0,68 = -5,32 = 1/10^{5,32}$$

$$\text{ELD}_{50} = 10^{-5,32}$$



Hình 3.1. Phôi chết có bệnh tích điển hình của TMUV

A: Phôi vịt 15 ngày tuổi khi tiêm PBS pH7,2. B và C: Phôi vịt 15 ngày tuổi tiêm virus bị chết phôi, có bệnh tích điển hình của bệnh TMUV.

Theo đó, liều ELD₅₀ được xác định là $10^{-5,32}$. Như vậy, liều gây chết 50% phôi trứng là $10^{-5,32}/0,2$ mL, tức là ở độ pha loãng $1/10^{5,32}$ khi tiêm 0,2mL huyền dịch virus TMUV (REP.V1.01.22) sẽ gây chết 50% phôi thí nghiệm (hay 0,2mL huyền dịch virus có chứa $10^{5,32}$ liều gây chết 50% phôi). Kết quả ELD₅₀ của chủng virus phân lập được từ nghiên cứu này tương đồng với ghi nhận của Nguyễn Thanh Ba và cộng sự, năm 2022, 3 chủng TMUV (TMUV01, 08 và 09) phân lập được từ khu vực phía Bắc có giá trị ELD₅₀ từ $10^{5,4}$ đến $10^{5,8}$ ELD₅₀/mL. Tuy nhiên liều gây chết 50% phôi trứng trong nghiên cứu này cao hơn so với chủng TMUV-NL1 ($10^{4,5}$ /mL) (Trương Minh Đạt và cs., 2023).

3.2. Bất hoạt chủng virus TMUV (REP.V1.01.22)

Thử nghiệm bất hoạt virus TMUV (REP.V1.01.22) với nồng độ $10^{-5,32}/0,2$ mL ELD₅₀ đã được thực hiện ở hai nhiệt độ khác nhau là 4°C và 37°C trong thời gian kéo dài từ 12 đến 48 giờ bằng dung dịch BEI nồng độ cuối cùng là 0,2%. Sau mỗi chu kỳ ủ, hiệu quả bất hoạt virus bất hoạt được kiểm tra bằng cách nuôi cấy trên tế bào muỗi *Aedes albopictus* dòng C6/36 và tiêm vào 5 trứng vịt có phôi 10 ngày tuổi. Kết quả chi tiết trong Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Kết quả thử nghiệm bất hoạt virus TMUV

Nhiệt độ	Thử nghiệm	Thời gian bất hoạt (giờ)	Thử nghiệm trên phôi trứng			Nuôi cấy trên tế bào C6/36
			Số phôi tiêm	Phôi sống	Phôi chết	CPE
4 ⁰ C	T12	12	5	0	5	+
	T24	24	5	0	5	+
	T36	36	5	1	4	+
	T48	48	5	2	3	+
	TMUV không bất hoạt	48	5	0	5	+
	PBS pH=7,2	48	5	5	0	-
37 ⁰ C	T12	12	5	4	1	+
	T24	24	5	5	0	-
	T36	36	5	5	0	-
	T48	48	5	5	0	-
	TMUV không bất hoạt	48	5	0	5	+
	PBS pH=7,2	48	5	5	0	-

Ghi chú: (CPE): Cytopathic Effect (+): có CPE sau 10 ngày nuôi cấy, (-): không có CPE sau 10 ngày nuôi cấy.

Kết quả cho thấy khi bất hoạt virus ở 4°C sau 48 giờ, virus vẫn còn khả năng gây chết phôi vịt và hiện tượng CPE khi nuôi cấy tế bào muỗi *Aedes albopictus* dòng C6/36. Khi virus được bất hoạt ở 37 °C sau 24 giờ không còn khả năng gây chết phôi vịt và không tạo ra CPE khi nuôi cấy trên tế bào C6/36. Vì vậy, chủng virus TMUV- REP.V1.01.22 đã được bất hoạt hoàn toàn với nồng độ BEI là 0,2%, ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Chủng virus sau khi bất hoạt được sử dụng để gây miễn dịch cho gà mái đẻ giống ISA-Brown 6 tháng tuổi. Kết quả này tương đồng so với báo cáo của Lin và cộng sự, năm 2015, chủng Tembusu-HB được bất hoạt hoàn toàn ở 37°C trong 24 giờ bằng formaldehyde 0,1%, không ghi nhận có CPE sau khi nuôi cấy trên tế bào BHK-21.

3.3. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể (HGKT) Tembusu trong máu gà

Máu gà được lấy 2 tuần 1 lần để kiểm tra HGKT. Kết quả kiểm tra HGKT của gà ở lô 10⁻¹ x ELD₅₀ qua các tuần được trình bày ở Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong máu gà của lô thí nghiệm $10^{-1} \times \text{ELD}_{50}$ qua các tuần

Nghiệm thức	HGKT trong máu gà qua các tuần (xlog2)									
	T0	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14	T16	GMT± StDev
$10^{-1} \times \text{ELD}_{50}/2$	0,00 ⁱ	5,67 ^{fgh}	5,11 ^{gh}	6,00 ^{fg}	6,44 ^{def}	6,22 ^{ef}	6,11 ^f	6,33 ^{def}	6,33 ^{def}	6,03±0,44 ^B
$10^{-1} \times \text{ELD}_{50}/3$	0,00 ⁱ	6,11 ^f	5,00 ^h	7,11 ^{cde}	7,56 ^{abc}	7,56 ^{abc}	7,56 ^{abc}	7,22 ^{cd}	7,44 ^{bc}	6,94±0,92 ^{AB}
$10^{-1} \times \text{ELD}_{50}/4$	0,00 ⁱ	5,56 ^{fgh}	5,11 ^{gh}	7,78 ^{abc}	8,00 ^{abc}	8,44 ^a	8,22 ^{ab}	8,33 ^{ab}	8,33 ^{abc}	7,47±1,34 ^A
Đối chứng	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00±0,00 ^C

Ghi chú: Các ký tự a, b, c, ... (A, B, C, ...) là thứ tự sắp xếp từ cao đến thấp theo nhóm giá trị HGKT.

Các giá trị trung bình mang cùng một chữ cái thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

GMT: Hiệu giá kháng thể trung bình theo từng nghiệm thức từ T2 đến T16.

$10^{-1} \times \text{ELD}_{50}/2$: Nghiệm thức gây miễn dịch 2 lần với liều $10^{-1} \times \text{ELD}_{50}$.

$10^{-1} \times \text{ELD}_{50}/3$: Nghiệm thức gây miễn dịch 3 lần với liều $10^{-1} \times \text{ELD}_{50}$.

$10^{-1} \times \text{ELD}_{50}/4$: Nghiệm thức gây miễn dịch 4 lần với liều $10^{-1} \times \text{ELD}_{50}$.

Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong máu gà của lô thí nghiệm $10^{-1} \times \text{ELD}_{50}$ qua các tuần cho thấy ở cả 3 nghiệm thức trước khi gây miễn dịch đều không có kháng thể kháng TMUV và sau khi gây miễn dịch có hiệu giá kháng thể dao động từ 5,00 đến 8,44 log2. Cả 3 nghiệm thức gây miễn dịch đều có kháng thể trong máu cao sau 2 tuần từ 5,56 đến 6,11 log2 và giảm nhẹ vào tuần T4 (2 tuần sau khi gây miễn dịch lần 2). Đối với nghiệm thức $10^{-1} \times \text{ELD}_{50}/2$ và $10^{-1} \times \text{ELD}_{50}/3$ HGKT đạt cao nhất vào tuần T8 lần lượt là 6,44 và 7,56 log2 sau đó duy trì ổn định đến tuần T16. Nghiệm thức $10^{-1} \times \text{ELD}_{50}/4$ HGKT đạt cao nhất vào tuần T10 (8,44 log2) sau đó duy trì ổn định đến tuần T16. Nhìn chung, 3 nghiệm thức gây miễn dịch với liều $10^{-1} \times \text{ELD}_{50}$ thì nghiệm thức gây miễn dịch 4 lần đạt HGKT trung bình từ tuần T2 đến T16 cao nhất (7,47 log2), sau đó đến nghiệm thức gây miễn dịch 3 và 2 lần (lần lượt là 6,94 và 6,03 log2), sự khác biệt HGKT trung bình giữa 3 nghiệm thức có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

Bảng 3.4. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong máu gà của lô thí nghiệm $10^0 \times \text{ELD}_{50}$ qua các tuần

Nghiệm thức	HGKT trong máu gà qua các tuần (xlog2)									
	T0	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14	T16	GMT± StDev
$10^0 \times \text{ELD}_{50}/2$	0,00 ^d	7,56 ^b	6,22 ^c	7,33 ^{bc}	7,44 ^b	7,56 ^b	7,44 ^b	7,56 ^b	7,56 ^b	7,33±0,46 ^B
$10^0 \times \text{ELD}_{50}/3$	0,00 ^d	7,11 ^{bc}	6,44 ^{bc}	9,67 ^a	9,55 ^a	9,89 ^a	9,67 ^a	9,67 ^a	9,56 ^a	8,94±1,35 ^A
$10^0 \times \text{ELD}_{50}/4$	0,00 ^d	7,22 ^{bc}	6,22 ^c	9,11 ^a	9,00 ^a	9,44 ^a	9,67 ^a	9,78 ^a	9,56 ^a	8,75±1,31 ^A
Đối chứng	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00±0,00 ^C

Ghi chú: Các ký tự a, b, c, ... (A, B, C, ...) là thứ tự sắp xếp từ cao đến thấp theo nhóm giá trị HGKT.

Các giá trị trung bình mang cùng một chữ cái thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

GMT: Hiệu giá kháng thể trung bình theo từng nghiệm thức từ T2 đến T16.

$10^0 \times \text{ELD}_{50}/2$: Nghiệm thức gây miễn dịch 2 lần với liều $10^0 \times \text{ELD}_{50}$.

$10^0 \times \text{ELD}_{50}/3$: Nghiệm thức gây miễn dịch 3 lần với liều $10^0 \times \text{ELD}_{50}$.

$10^0 \times \text{ELD}_{50}/4$: Nghiệm thức gây miễn dịch 4 lần với liều $10^0 \times \text{ELD}_{50}$.

Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong máu gà của lô thí nghiệm $10^0 \times \text{ELD}_{50}$ (Bảng 3.4) cho thấy cả 3 nghiệm thức gây miễn dịch đều không có kháng thể ở tuần T0 và có kháng thể trong máu cao sau 2 tuần từ 7,11 đến 7,56 log2 và giảm nhẹ vào tuần T4. Đối với nghiệm thức $10^0 \times \text{ELD}_{50}/2$ HGKT đạt thấp nhất trong 3 nghiệm thức vào và duy trì ổn định từ tuần T6 đến T8 (dao động 7,33 đến 7,56 log2). Nghiệm thức $10^0 \times \text{ELD}_{50}/3$ và $10^0 \times \text{ELD}_{50}/4$ đạt HGKT cao hơn dao động từ tuần T6 đến T16 là 9,00 đến 9,89 log2. Nhìn chung, 3 nghiệm thức gây miễn dịch với liều $10^0 \times \text{ELD}_{50}$ thì nghiệm thức gây miễn

dịch 3 lần đạt HGKT trung bình cao nhất (8,94 log₂) và sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ở mức P<0,05 đối với nghiệm thức 10⁰ x ELD₅₀ (8,75 log₂).

Bảng 3.5. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong máu gà của lô thí nghiệm 10¹ x ELD₅₀ qua các tuần

Nghiệm thức	HGKT trong máu gà qua các tuần (xlog ₂)									GMT± StDev
	T0	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14	T16	
10 ¹ xELD ₅₀ /2	0,00 ^h	7,33 ^{efg}	6,22 ^g	7,44 ^{efg}	7,78 ^{def}	7,78 ^{def}	7,78 ^{def}	7,89 ^{cdef}	8,00 ^{bcdef}	7,53±0,57 ^B
10 ¹ xELD ₅₀ /3	0,00 ^h	7,89 ^{cdef}	6,56 ^{fg}	8,67 ^{abcde}	9,22 ^{abcd}	9,67 ^a	9,44 ^{ab}	9,56 ^{ab}	9,44 ^{ab}	8,81±1,08 ^A
10 ¹ xELD ₅₀ /4	0,00 ^h	7,22 ^{efg}	6,00 ^g	9,00 ^{abcd}	9,33 ^{abc}	9,78 ^a	9,56 ^a	9,56 ^a	9,67 ^a	8,76±1,38 ^{AB}
Đối chứng	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00±0,00 ^C

Ghi chú: Các ký tự a, b, c, ... (A, B, C, ...) là thứ tự sắp xếp từ cao đến thấp theo nhóm giá trị HGKT. Các giá trị trung bình mang cùng một chữ cái thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức P<0,05. GMT: Hiệu giá kháng thể trung bình theo từng nghiệm thức từ T2 đến T16.

10¹x ELD₅₀/2: Nghiệm thức gây miễn dịch 2 lần với liều 10¹ x ELD₅₀.

10¹ x ELD₅₀/3: Nghiệm thức gây miễn dịch 3 lần với liều 10¹ x ELD₅₀.

10¹x ELD₅₀/4: Nghiệm thức gây miễn dịch 4 lần với liều 10¹ x ELD₅₀.

Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong máu gà từ lô thí nghiệm 10¹ x ELD₅₀ (Bảng 3.5) cho thấy rằng cả 3 nghiệm thức trước khi gây miễn dịch không ghi nhận sự có mặt của kháng thể TMUV. Tuy nhiên, sau khi gây miễn dịch 2 tuần, mức độ kháng thể trong máu đã tăng cao từ 7,22 đến 7,89 log₂ và sau đó giảm nhẹ vào tuần T4. Đối với nghiệm thức 10¹ x ELD₅₀/2 HGKT đạt thấp nhất trong 3 nghiệm thức vào và duy trì ổn định từ tuần T6 đến T16 (dao động 6,22 đến 8,00 log₂). Nghiệm thức 10¹ x ELD₅₀/3 và 10¹ x ELD₅₀/4 đạt HGKT cao hơn dao động lần lượt từ 8,67 đến 9,78 log₂ duy trì ổn định từ tuần T6 đến T16. Nhìn chung, 3 nghiệm thức gây miễn dịch với liều 10¹ x ELD₅₀ thì nghiệm thức gây miễn dịch 3 và 4 lần có hiệu giá kháng thể trung bình cao hơn so với gây miễn dịch 2 lần (lần lượt là 8,81, 8,76 và 7,53 log₂ và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức P<0,05).

Bảng 3.6. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong máu gà của lô thí nghiệm vaccine qua các tuần

Nghiệm thức	HGKT trong máu gà qua các tuần (xlog ₂)									GMT± StDev
	T0	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14	T16	
Vaccine /2	0,00 ^d	6,89 ^{abc}	6,33 ^c	6,78 ^{abc}	6,89 ^{abc}	7,00 ^{abc}	7,11 ^{abc}	7,00 ^{abc}	6,89 ^{abc}	6,86±0,24 ^B
Vaccine /3	0,00 ^d	7,67 ^{abc}	6,44 ^{bc}	7,56 ^{abc}	7,78 ^{abc}	7,89 ^{abc}	7,67 ^{abc}	7,78 ^{abc}	7,78 ^{abc}	7,57±0,47 ^A
Vaccine /4	0,00 ^d	6,89 ^{abc}	6,67 ^{abc}	8,22 ^{abc}	8,33 ^{abc}	8,67 ^a	8,56 ^{ab}	8,44 ^{abc}	8,33 ^{abc}	8,01±0,78 ^A
Đối chứng	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00±0,00 ^C

Ghi chú: Các ký tự a, b, c, ... (A, B, C, ...) là thứ tự sắp xếp từ cao đến thấp theo nhóm giá trị HGKT. Các giá trị trung bình mang cùng một chữ cái thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức P<0,05. GMT: Hiệu giá kháng thể trung bình theo từng nghiệm thức từ T2 đến T16.

Vaccine /2: Nghiệm thức gây miễn dịch 2 lần.

Vaccine /3: Nghiệm thức gây miễn dịch 3 lần.

Vaccine/4: Nghiệm thức gây miễn dịch 4 lần.

Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong máu gà từ lô thí nghiệm tiêm Vaccine TMUV Inactivated Strain HB (Bảng 3.6) cho thấy rằng cả 3 nghiệm thức trước khi gây miễn dịch

không ghi nhận sự có mặt của kháng thể TMUV. Tuy nhiên, sau khi gây miễn dịch 2 tuần, mức độ kháng thể trong máu đã tăng cao từ 6,89 đến 7,67 log₂ và sau đó giảm nhẹ vào tuần T4 sau đó tăng lên ở tuần T6 và duy trì ổn định đến tuần T16. Nhìn chung, 3 nghiệm thức gây miễn dịch bằng vaccine TMUV với 2, 3 và 4 lần tiêm nhắc lại thì nghiệm thức gây miễn dịch 3 và 4 lần đạt HGKT trung bình cao hơn so với nghiệm thức gây miễn dịch 2 lần (lần lượt là 7,57; 8,01 và 6,86 log₂), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức P<0,05.

Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong máu gà từ các nghiệm thức cho thấy HGKT trung bình ở nghiệm thức gây miễn dịch 3 lần với liều 10⁰ và 10¹ ELD₅₀ (lần lượt 8,94 và 8,81 log₂) cao hơn so với nghiệm thức gây miễn dịch với liều 10⁻¹ ELD₅₀ và nghiệm thức vaccine (lần lượt 6,94 và 7,57 log₂), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức P<0,05. Trung bình HGKT theo tuần thấp nhất vào tuần T4 (6,11 log₂) và duy trì ổn định từ tuần T6 đến T16, cao nhất ở tuần T10 đạt 8,75 log₂. Như vậy, nghiệm thức gây miễn dịch với liều 10⁰ ELD₅₀ tiêm nhắc lại 3 lần cho hiệu quả tối ưu về khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch trên gà.

3.4. Kết quả tạo chế phẩm kháng thể IgY

Sau khi xác định được liều 10⁰ ELD₅₀ là tối ưu dùng để gây miễn dịch cho gà, trứng gà của các nghiệm thức trong lô này đã được thu thập, lòng đỏ của 3 trứng trong mỗi tuần được đồng nhất và tiến hành tách chiết IgY. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể IgY bằng phương pháp HI được thể hiện ở Bảng 3.7.

Bảng 3.7. Kết quả kiểm tra HGKT IgY trong lòng đỏ trứng gà qua các tuần sau khi gây miễn dịch với liều 10⁰ xELD₅₀

Nghiệm thức	HGKT IgY trong lòng đỏ trứng gà qua các tuần (xlog ₂)									
	T0	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14	T16	GMT± StDev
10 ⁰ xELD ₅₀ /2	0,00 ^g	5,00 ^f	6,00 ^{de}	6,44 ^{cd}	7,00 ^{bc}	7,11 ^{bc}	7,00 ^{bc}	7,11 ^{bc}	7,22 ^{bc}	6,61±0,77 ^A
10 ⁰ xELD ₅₀ /3	0,00 ^g	5,11 ^{ef}	5,56 ^{def}	7,89 ^{ab}	8,56 ^a	8,56 ^a	8,33 ^a	8,44 ^a	8,56 ^a	7,63±1,44 ^A
10 ⁰ xELD ₅₀ /4	0,00 ^g	5,11 ^{ef}	5,67 ^{def}	7,78 ^{ab}	8,33 ^a	8,56 ^a	8,44 ^a	8,22 ^a	8,44 ^a	7,57±1,37 ^A
Đối chứng	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00±0,00 ^B

Ghi chú: Các ký tự a, b, c,... (A, B, C,...) là thứ tự sắp xếp từ cao đến thấp theo nhóm giá trị HGKT.

Các giá trị trung bình mang cùng một chữ cái thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức P<0,05.

GMT: Hiệu giá kháng thể trung bình theo từng nghiệm thức từ T2 đến T16.

10⁰ x ELD₅₀/2: Nghiệm thức gây miễn dịch 2 lần với liều 10⁰ x ELD₅₀.

10⁰ x ELD₅₀/3: Nghiệm thức gây miễn dịch 3 lần với liều 10⁰ x ELD₅₀.

10⁰ x ELD₅₀/4: Nghiệm thức gây miễn dịch 4 lần với liều 10⁰ x ELD₅₀.

Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong lòng đỏ trứng gà của lô thí nghiệm 10⁰ x ELD₅₀ (Bảng 4.12) cho thấy cả 3 nghiệm thức gây miễn dịch đều không có kháng thể ở tuần T0 và bắt đầu có kháng thể trong lòng đỏ trứng sau 2 tuần từ 5,00 log₂ đến 5,11 log₂. HGKT trung bình của nghiệm thức 10⁰ x ELD₅₀/3 đạt cao nhất, kế tiếp là nghiệm thức 10⁰ x ELD₅₀/4 và 10⁰ x ELD₅₀/2 (lần lượt là 7,63; 7,57 và 6,61 log₂). Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ở mức P<0,05.

4. KẾT LUẬN

Chủng virus TMUV- REP.V1.01.22 với liều gây chết 50% phôi vịt ELD₅₀ là 10^{-5,32} đã được bất hoạt hoàn toàn với nồng độ BEI là 0,2%, ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ.

Chủng virus TMUV- REP.V1.01.22 sau khi bất hoạt, gây miễn dịch lặp lại 3 lần, mỗi lần cách nhau 2 tuần với liều 10⁰ ELD₅₀ trên gà mái đẻ giống ISA Brown 20 tuần tuổi đạt hiệu giá kháng thể cao nhất (9,89 log₂), kéo dài và ổn định.

Hiệu giá kháng thể TMUV trong huyết thanh và lòng đỏ trứng duy trì ổn định từ tuần 6 đến tuần 16, đạt cao nhất vào tuần T10.

Trung bình hiệu giá kháng thể IgY trong lòng đỏ trứng được thu từ gà mái gây miễn dịch với liều 10⁰ ELD₅₀, lặp lại 3 lần, sau khi tinh sạch có hiệu giá kháng thể TMUV đạt 7,63 log₂.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Anh Việt, Trần Thị Ngọc Quy, Nguyễn Thị Bích Thuởng, Trà Toàn, Huỳnh Thị Kim Loan, Phạm Thái Bình, Ngô Quốc Cường (2023). Xây dựng quy trình phát hiện kháng thể kháng virus Tembusu trong huyết thanh vịt. *Khoa học kỹ thuật thú y*, 30 (6): 35-39.
2. Đặng Hữu Anh, Nguyễn Văn Giáp, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, (2020). Một số kết quả bước đầu về Tembusu virus ở vịt bệnh tại Hà Nội. *Khoa học kỹ thuật thú y*, 28 (1) : 22-28.
3. Trương Minh Đạt Và Hoàng Thanh Hải., (2023). Phân lập và phân tích đặc điểm di truyền của virus Tembusu (flavivirus) trên vịt. *Nông nghiệp và Phát triển*. 22 (4): 42-48.
4. Ko K.Y., Ahn D. U., (2007). Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. *Poultry Science*. 86 (2): 400-407.
5. Cao Z., Zhang C., Liu Y., Ye W., Han J., Ma G., Zhang D., Xu F., Gao X., Tang Y. (2011). Tembusu virus in ducks, China. *Emerging infectious diseases*.17(10): 1873.
6. Su J., Li S., Hu X., Yu X., Wang Y., Liu P. (2011). Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu-related flavivirus. *PLoS ONE*. 6:e18106.
7. Zhang W., Chen S., Mahalingam S., Fu M., Cheng A.(2017). An updated review of avian-origin Tembusu virus: a newly emerging avian Flavivirus. *Journal of General Virology*. 98 (10): 2413-2420.
8. Nguyễn Thanh Ba, Nguyễn Thị Bích, Quách Thị Minh Hiền, Nguyễn Thu Trang Trang, Nguyễn Thùy Ninh, và Trần Văn Khánh., (2022). Phân lập và xác định một số đặc điểm sinh học của Duck Tembusu Virus tại một số tỉnh phía Bắc. *Khoa học kỹ thuật thú y*, 29(5): 5-13.
9. Reed L. J., Muench H., (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints", *American Journal of Epidemiology*, 27(3): 493-497.
10. Vũ Thị Thu Hằng, Lê Quốc Hòa, Trịnh Thị Bích Ngọc, Vũ Xuân Đăng, Nguyễn Thị Yến, Nguyễn Văn Tâm, Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Thị Lan, và Lê Văn Phan., (2019). Tinh chế kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng gà và ứng dụng trong phòng và trị bệnh Gumboro trên gà. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 17(12): 976-985.

11. Nguyễn Văn Tâm, Vũ Thị Thu Hằng, Trịnh Thị Bích Ngọc, Vũ Xuân Đăng, và Nguyễn Thị Yến., (2020). Ứng dụng kháng thể IgY chế từ lòng đỏ trứng gà để phòng và trị bệnh Newcastle trên gà. *Khoa học kỹ thuật chăn nuôi*. 256: 90-98.