

NGHIÊN CỨU TẠO VẮC XIN VÔ HOẠT PHÒNG BỆNH HOẠI TỬ THẦN KINH TRÊN CÁ MÚ (*Epinephelus* sp.) QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

Mẫn Hồng Phước^{1,2,*}, Phạm Thị Tâm², Đồng Văn Quyền¹, Vũ Thị Bích Huyền³, Lê Minh Hải⁴

TÓM TẮT

Bệnh hoại tử thần kinh là bệnh cấp tính, gây chết hàng loạt cá mú ở giai đoạn ấu trùng và cá bột. Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu tạo vắc xin bất hoạt phòng bệnh hoại tử thần kinh cho cá mú nuôi ở quy mô phòng thí nghiệm. Chủng vi rút gây bệnh hoại tử thần kinh TB05 được phân lập từ tỉnh Thái Bình có độc lực là $TCID_{50} = 10^{6.8}$ và $LD_{50} = 10^{7.5}$ được lựa chọn làm chủng nghiên cứu chế tạo vắc xin. Vi rút được bất hoạt bằng beta - propiolactone 0,1% và phối hợp với hydroxit nhôm để tạo vắc xin. Bằng phương pháp ngâm, vắc xin an toàn đối với cá mú từ giai đoạn ấu trùng đến cá bột, tỷ lệ bảo hộ với các liều công cường độ $0,2 \times TCID_{50}$, $0,5 \times TCID_{50}$ và $1 \times TCID_{50}$ đạt trên 75%. Kết quả của nghiên cứu làm tiền đề cho việc sản xuất vắc xin phòng ngừa bệnh hoại tử thần kinh cho cá mú, giúp phát triển bền vững nghề nuôi cá mú tại Việt Nam.

Từ khóa: Vắc xin, vi rút gây bệnh hoại tử thần kinh, công cường độ, bảo hộ, cá mú.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh hoại tử thần kinh (viral nervous necrosis disease - VNN) là một bệnh cấp tính và cũng là một trong những nguyên nhân chính gây ra thiệt hại lớn về kinh tế trong nghề nuôi cá biển và nuôi trồng thủy sản công nghiệp. Tác nhân VNN là vi rút thuộc giống *Betanodavirus*, họ *Nodaviridae* [12], [8], [4], [11], [9], [1]. Để phòng bệnh do vi rút gây ra thì vắc xin là biện pháp hữu hiệu. Cho đến nay, nhiều loại vắc xin phòng VNN đã được nghiên cứu và thử nghiệm. Một số loại vắc xin phòng VNN đã được phát triển như vắc xin bất hoạt, vắc xin tái tổ hợp, các loại vắc xin này đã mang lại hiệu quả nhất định [3]. Vắc xin tái tổ hợp được sử dụng trên nhiều loài cá khác nhau, như cá mú vây dài (*Epinephelus septemfasciatus*) [15], cá mú lưng gù (*Cromileptes altivelis*) [6], cá mú đốm cam (*Epinephelus coioides*) [2] và cá chẽm châu Á (*Lates calcarifer*) [18]. Kết quả cho thấy, vắc xin tạo ra kháng thể đặc hiệu và có tỷ lệ bảo hộ dao động từ 67% đến 82% ở cá trưởng thành. Tuy nhiên, vắc xin tái tổ hợp cũng còn những hạn chế nhất định như giá thành cao, hiệu quả bảo hộ thấp [7], [14], [16].

Hiện nay, một số loại vắc xin bất hoạt phòng bệnh VNN đã được phát triển như vắc xin bất hoạt

phòng bệnh hoại tử thần kinh cho cá mú lưng gù, cá mú đốm cam [5], cá mú đốm đỏ (RGNNV), cá mú vây dài [17] và cá mú cẩm thạch nâu (*Epinephelus fuscoguttatus*) [10]. Hiệu quả bảo hộ của các loại vắc xin này dao động từ 86% đến 100%. Mặc dù vắc xin bất hoạt đặc hiệu và hiệu quả hơn so với vắc xin tái tổ hợp trong phòng chống VNN, nhưng sự đa dạng của các chủng vi rút gây bệnh VNN đòi hỏi phải nghiên cứu lựa chọn tạo vắc xin từ chính các chủng vi rút thực địa có độ tương đồng kháng nguyên cao với các chủng vi rút gây bệnh tại mỗi nước hay mỗi khu vực. Nghiên cứu này trình bày kết quả tạo vắc xin vô hoạt phòng bệnh hoại tử thần kinh trên cá mú (*Epinephelus* sp.) từ chủng thực địa của Việt Nam ở quy mô phòng thí nghiệm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Chủng vi rút gây bệnh hoại tử thần kinh TB05 được phân lập từ mô mắt và não của cá mú nghi mắc bệnh tại Cồn Vành, Thái Bình, lưu trữ - 80°C tại Khoa Công nghệ sinh học, Viện Đại học Mở Hà Nội.

- Cá thí nghiệm: cá mú giống (*Epinephelus coioides*) (1,5 cm) được cung cấp bởi Trung tâm Quốc gia Giống hải sản miền Bắc, Xuân Đán, Cát Bà, Hải Phòng. Cá được kiểm tra không nhiễm vi rút gây bệnh hoại tử thần kinh bằng phản ứng RT - PCR và nuôi trong bể xi măng.

¹ Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Viện Đại học Mở Hà Nội

* Email: manphuc@gmail.com

³ Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

⁴ Trường Đại học Vinh

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nuôi cấy vi rút

Vi rút TB05 được nuôi bằng tế bào GS01 (Đại học Wageningen, Hà Lan). Trước khi sử dụng, tế bào được hoạt hóa trong chai nuôi cấy với môi trường Leibovitz's L - 15 có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê (Fetal Calf Serum - FCS, Sigma). Tế bào được nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ 27°C, 5% CO₂ trong 2 ngày để đạt mật độ 10⁵ tế bào/ml. Sau đó lây nhiễm với chủng TB05. Theo dõi hiệu ứng huỷ hoại tế bào (Cytopathic Effect - CPE) mỗi ngày. Khi CPE đạt khoảng 90% - 95% tiến hành thu dịch vi rút khỏi chai nuôi cấy rồi ly tâm thu dịch nổi có chứa vi rút.

2.2.2. Chuẩn độ vi rút TCID₅₀ (Tissue Culture Infective Dose, 50%)

Chuẩn độ vi rút được thực hiện trên đĩa nhựa 96 giếng nuôi tế bào GS01. Dịch vi rút được pha loãng theo hệ số 10 trong dung dịch muối cân bằng Hanks (Hank's Balanced Salt Solution - HBSS). Vi rút được hấp phụ vào tế bào trong 2 giờ. Tiếp tục nuôi tế bào bằng Leibovitz's L - 15 có 10% FCS. Quan sát CPE trong vòng 5 ngày để xác định TCID₅₀ theo phương pháp của Reed và Muench (1938) [13].

$$\lg \text{TCID}_{50} = \lg A + x1 \lg f$$

$$\lg \text{TCID}_{50} = \lg A + x2 \lg f$$

Trong đó: f là hệ số pha loãng

$$x1 = \frac{50-A1}{A1-B1} \quad x2 = \frac{50-B1}{A1-B1}$$

A: độ pha loãng với tỷ lệ cận trên có bệnh tích,
A1: tỷ lệ cận trên có bệnh tích.

B: độ pha loãng với tỷ lệ cận dưới có bệnh tích,
B1: tỷ lệ cận dưới có bệnh tích.

2.2.3. Phương pháp gây bất hoạt vi rút

Đối với vắc xin vô hoạt, việc lựa chọn hóa chất làm chết mầm bệnh nhưng vẫn duy trì tính sinh miễn dịch đóng vai trò quyết định cho tính toàn vẹn của kháng nguyên cũng như độ an toàn của vắc xin. Trong nghiên cứu này, NNV được bất hoạt bằng 3 hóa chất:

+ Bất hoạt bằng formalin (formaldehyde 35%): formalin được bổ sung vào dịch vi rút để đạt nồng độ 0,1% và 0,2%. Hỗn hợp được ủ ở 37°C/24 giờ. Formalin được loại khỏi dịch bất hoạt bằng cách trung hòa với PBS trong 12 giờ.

+ Bất hoạt bằng Binary ethylenimine (BEI): BEI 0,1M bổ sung vào dịch vi rút để đạt nồng độ 0,001M và 0,002M. Hỗn hợp được ủ ở 37°C/36 giờ. BEI được loại khỏi dịch bất hoạt bằng cách trung hòa với 1M Na - thiosulfate (Merck) trong 12 giờ.

+ Bất hoạt bằng beta - propiolactone: chỉnh pH của dịch vi rút 7,3, bổ sung beta - propiolactone theo tỷ lệ 1: 2000 (v/v). Khuấy hỗn hợp bằng máy khuấy từ trong 24 giờ/4°C. Beta - propiolactone được loại bỏ bằng cách chỉnh pH về 7,0, 37°C/24 giờ.

Dịch vi rút TB05 sau khi bất hoạt bằng formalin, BEI, beta - propiolactone được gây miễn dịch cho thỏ 2 lần, lần 2 cách lần thứ nhất 7 ngày với liều TCID₅₀ = 10^{6,8}, định kỳ 7 ngày 1 lần sau lần gây miễn dịch đầu tiên, lấy huyết thanh thử để thực hiện phản ứng ELISA nhằm xác định khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của vi rút bất hoạt và lựa chọn hóa chất gây bất hoạt phù hợp để sản xuất vắc xin.

2.2.4. Phản ứng ELISA

Phản ứng được thực hiện với kháng thể pha loãng trong dung dịch đệm carbonate, mỗi giếng phủ 100 µl rồi ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Dịch kháng nguyên pha loãng theo tỷ lệ 1/400 trong PBS, ủ ở nhiệt độ 37°C/1 giờ, goat anti - rabbit IgG HRPO (Sigma) pha loãng 1/10.000, ủ ở nhiệt độ phòng trong 45 phút, cơ chất sinh màu TMB ủ trong 15 phút ở 37°C và dừng phản ứng bằng H₂SO₄ 1M. Đọc kết quả phản ứng trên máy đọc đĩa ELISA, bước sóng 450 nm.

2.2.5. Thí nghiệm lựa chọn chất bổ trợ của vắc xin

Dịch vi rút sau khi bất hoạt được tạo dạng keo phen với chất bổ trợ là aluminum hydroxide (AH) và aluminum phosphate (AP). Thí nghiệm đánh giá khả năng bảo hộ của vắc xin được bố trí thành 2 lô, mỗi lô 200 cá mú bột (1,5 cm) được gây miễn dịch bằng phương pháp ngâm với vắc xin vô hoạt bổ sung keo phen với AH hoặc AP, thời gian 10 phút có sục khí, sử dụng vắc xin 2 lần, mỗi lần cách nhau 10 ngày. Lô đối chứng, cá được ngâm với giả dược (keo phen AH hoặc AP).

Cá mú bột sau khi sử dụng vắc xin được nuôi trong điều kiện ổn định về nhiệt độ 25°C - 27°C và nồng độ muối 25‰ - 30‰. Theo dõi cá trong 30 ngày để đánh giá mức độ an toàn và thực hiện thí nghiệm đánh giá hiệu quả bảo hộ của vắc xin.

+ Mức độ an toàn của vắc xin được đánh giá thông qua các triệu chứng lâm sàng và tỷ lệ sống của cá sau khi sử dụng vắc xin. Tỷ lệ sống được tính theo công thức:

Tỷ lệ sống = $(1 - \text{tỷ lệ tử vong của cá được tiêm vắc xin} / \text{tỷ lệ tử vong của cá không được tiêm vắc xin}) \times 100$.

+ Hiệu lực của vắc xin được đánh giá bằng phương pháp thử thách cường độ. Cá mú thí nghiệm (cá được ngâm vắc xin) và lô đối chứng (cá được ngâm với giả dược) tại ngày thứ 30 sau khi gây miễn dịch được chia thành 6 nhóm, mỗi nhóm 30 cá rồi công cường độc riêng rẽ với chủng NNV TB05 ($\text{TCID}_{50} = 10^{6,8} \text{PFU/ml}$) với các liều: $0,2 \times \text{TCID}_{50}$, $0,5 \times \text{TCID}_{50}$, $1 \times \text{TCID}_{50}$, $2 \times \text{TCID}_{50}$, $3 \times \text{TCID}_{50}$, $4 \times \text{TCID}_{50}$. Tiếp tục theo dõi cá trong 15 ngày để đánh giá mức độ bảo hộ. Tỷ lệ bảo hộ được tính bằng công thức:

Tỷ lệ bảo hộ = $(\text{tỷ lệ chết ở lô giả dược} - \text{tỷ lệ chết ở lô sử dụng vắc xin}) / \text{tỷ lệ chết ở lô giả dược} \times 100\%$.

2.2.6. Thí nghiệm xác định hiệu lực vắc xin trên mô hình thực địa

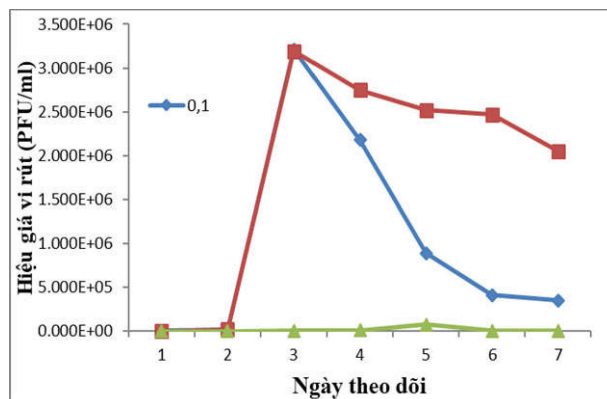
Thí nghiệm đánh hiệu lực vắc xin trên mô hình thực nghiệm được bố trí thành 2 lô kèm đối chứng. Lô thí nghiệm được ngâm vắc xin, liều vắc xin là 1 ml/20 ấu trùng hoặc 1 ml/5 cá bột ($\text{TCID}_{50} = 10^{6,8} \text{PFU/ml}$), thời gian xử lý vắc xin 30 phút trong bể sục khí, số liều sử dụng là 2. Vắc xin được sử dụng từ giai đoạn ấu trùng nuôi (lần 1) trong bể ương và giai đoạn cá giống chuyển ra bể nuôi trên biển và ao đất (lần 2). Lô đối chứng không ngâm vắc xin, các lô thí nghiệm được nuôi trong điều kiện nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} - 27^{\circ}\text{C}$, nồng độ muối 25‰ - 30‰. Theo dõi trong 90 ngày đánh giá mức độ bảo hộ, các chỉ tiêu tăng trọng của cá.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định liều gây nhiễm vi rút vào tế bào miễn cảm

Chủng NNV TB05 được gây nhiễm vào tế bào GS01 như mô tả ở trên, với hiệu giá $\text{TCID}_{50} = 10^{6,8} \text{PFU/ml}$.

Kết quả trong hình 1 cho thấy, ở liều gây nhiễm thấp nhất là 0,001, hiệu giá vi rút luôn ở mức thấp và chỉ tăng nhẹ vào ngày thứ 5, mức hiệu giá này không đạt tiêu chuẩn để sản xuất vắc xin. Ở liều gây nhiễm cao nhất là 0,1, tế bào bị hủy hoại từ ngày thứ 3 sau gây nhiễm và hiệu giá vi rút đã đạt cao nhất ở thời điểm này, vào những ngày tiếp theo, ngay cả khi đĩa nuôi cấy vi rút được bổ sung môi trường duy trì, hiệu giá vi rút vẫn giảm. Kết quả này chứng tỏ rằng liều gây nhiễm 0,1 cho hiệu giá vi rút cao nhưng cũng gây hủy hoại tế bào nhanh và mạnh, trong khi đó, liều gây nhiễm 0,01 hiệu giá vi rút cao nhất ở ngày thứ 3 và duy trì tế bào đến ngày thứ 5. Nghiên cứu trên thế giới cũng cho thấy việc duy trì tế bào và tạo các đỉnh hiệu giá vi rút sau các lần thay môi trường duy trì đã cho phép nhân nuôi và thu hoạch vi rút với hiệu giá vi rút cao, điều này giúp tiết kiệm tế bào, chủng giống vi rút, môi trường, giá thể nuôi cấy và nhân công. Do vậy liều gây nhiễm 0,01 được chọn để gây nhiễm vi rút lên tế bào GS01 [10].



Hình 1. Hiệu giá vi rút theo ngày gây nhiễm NNV vào tế bào GS01

3.2. Bất hoạt vi rút

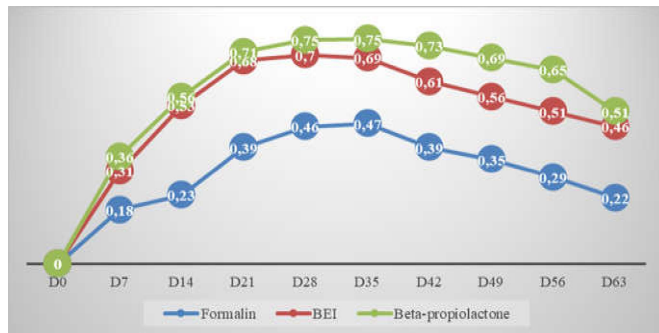
Vi rút được xử lý bất hoạt với ba loại hóa chất là formaldehyde, beta - propiolactone và BEI với các nồng độ tương ứng là: 0,1% và 0,2%; 0,05% và 0,1%; 0,001M và 0,002M rồi gây nhiễm trở lại trên đĩa tế bào GS01 để đánh giá mức độ bất hoạt thông qua sự hình thành bệnh tích tế bào (CPE). Kết quả được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả đánh giá mức độ bất hoạt của NNV

Các chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ formalin		Nồng độ BEI		Nồng độ beta -propiolactone	
	0,1%	0,2%	0,001M	0,002M	0,05%	0,1%
Mức độ hủy hoại tế bào (CPE %)	65	0	15	0	35	0

Kết quả trong bảng 1 cho thấy, các hóa chất formaldehyde, beta - propiolactone và BEI đều có khả năng gây bất hoạt vi rút NNV với các nồng độ gây bất hoạt tương ứng là 0,2%, 0,1% và 0,002M.

Tiếp tục đánh giá khả năng tạo kháng thể đặc hiệu của vi rút bất hoạt bằng phương pháp ELISA cho kết quả trong hình 2.



Hình 2. Kết quả thực hiện phản ứng ELISA phát hiện kháng thể đặc hiệu ở thỏ được tiêm vi rút bất hoạt (OD₄₅₀)

Kết quả ở hình 2 cho thấy, hiệu giá kháng thể đặc hiệu được tạo ra từ vi rút bất hoạt với BEI và beta - propiolactone cao hơn đáng kể so với vi rút bất hoạt với formalin. Kết quả trong hình 2 và bảng 1 cho thấy, formaldehyde có khả năng bất hoạt vi rút

nhưng làm giảm mức độ tạo đáp ứng miễn dịch. Trong khi đó BEI và beta - propiolactone với nồng độ tương ứng là 0,002M và 0,1% có thể gây bất hoạt hoàn toàn NNV nhưng vẫn đảm bảo tính kháng nguyên của vi rút. Tuy nhiên vi rút bất hoạt bằng beta - propiolactone cho hiệu giá kháng thể cao và thời gian dài hơn so với bất hoạt bằng BEI. Do vậy, beta - propiolactone 0,1% được chọn làm hóa chất bất hoạt vi rút.

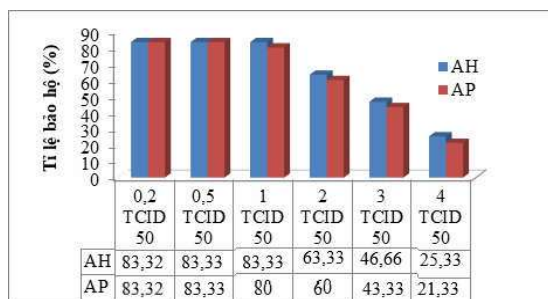
3.3. Chọn lọc chất bổ trợ vắc xin

Để sản xuất được vắc xin phòng bệnh hoại tử thần kinh có hiệu quả, ngoài giống vi rút thì việc nghiên cứu xác định chất bổ trợ ổn định, phù hợp với phương thức sử dụng cũng như đặc điểm sinh lý của cá từ giai đoạn ấu trùng đến cá bột cũng là một yếu tố quyết định đến chất lượng của sản phẩm và đáp ứng được yêu cầu khi sản xuất ứng dụng.

Trong nghiên cứu này, chủng NNV TB05 được sử dụng ở 2 dạng để gây đáp ứng miễn dịch, bao gồm: vi rút bất hoạt và vi rút bất hoạt phối hợp với các chất bổ trợ là aluminum hydroxide (AH) và aluminum phosphate (AP), liều kháng nguyên sử dụng là 10^{6,8}PFU/ml. Kết quả trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Xác định mức độ an toàn của vắc xin

STT	Loại vắc xin	Tỷ lệ chết (%)	Tỷ lệ sống (%)	Biểu hiện lâm sàng
1	NNV + AH	4	96	Hai ngày đầu sau khi xử lý vắc xin cá ăn kém, bơi lội chậm chạp. Các ngày tiếp theo biểu hiện bình thường. Tăng trưởng của cá không thay đổi so với lô đối chứng âm.
2	NNV + AP	3	97	Hai ngày đầu sau khi xử lý vắc xin cá ăn kém, bơi lội chậm chạp. Các ngày tiếp theo biểu hiện bình thường. Tăng trưởng của cá không thay đổi so với lô đối chứng âm.
3	Đối chứng âm (không sử dụng vắc xin hoặc chất bổ trợ)	2	98	Các hoạt động sinh lý và biểu hiện lâm sàng bình thường.



Hình 3. So sánh mức độ bảo hộ cá với vắc xin vô hoạt có chất bổ trợ khác nhau

Nhìn chung, các lô cá sử dụng vắc xin có chất bổ trợ đều có biểu hiện giảm ăn, phản xạ bơi lội kém trong hai ngày đầu sau khi tiêm vắc xin. Tuy nhiên, các ngày sau đó, hoạt động sinh lý của cá trở lại bình thường. Kết quả này chứng tỏ vắc xin an toàn đối với cá thí nghiệm.

Thí nghiệm đánh giá khả năng bảo hộ của vắc xin sau 15 ngày theo dõi tiếp theo sau công cường độc. Kết quả cho thấy, tỷ lệ cá sống sót ở các lô thí nghiệm và đối chứng là tương đương hình 3.

Kết quả thể hiện trong hình 3 cho thấy, tỷ lệ bảo hộ tương đối của cá được gây miễn dịch với các kháng nguyên có bổ sung nhôm hydroxit và nhôm phosphate cho khả năng bảo hộ cao với các liều 0,2 x TCID₅₀, 0,5 x TCID₅₀ và 1 x TCID₅₀, tất cả các lô thí nghiệm đều cho tỷ lệ bảo hộ trên 75%. Kết quả thí nghiệm cho phép lựa chọn nhôm hydroxit làm chất bổ trợ vắc xin phòng bệnh hoại tử thần kinh cho cá mú.

3.4. Đánh giá hiệu lực vắc xin ở mô hình thực địa

Hiệu lực của một vắc xin phòng bệnh cho cá không chỉ phụ thuộc vào chất lượng của kháng nguyên mà còn bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác

như căn nguyên bệnh, tuổi cá, đường đưa vắc xin, nhiệt độ môi trường nước trong quá trình sử dụng vắc xin, kỹ thuật sử dụng.

Vắc xin bất hoạt keo phen phòng bệnh hoại tử thần kinh được thử nghiệm tại trại cá mú giống của Trung tâm Quốc gia Giống hải sản miền Bắc. Kết quả theo dõi cá thể hiện ở bảng 3.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy tỷ lệ sống của cá ở các mô hình thử nghiệm vắc xin cao hơn so với các ao/lồng nuôi đối chứng đạt từ 30% - 34%, đồng thời tỷ lệ tăng trọng của cá ở các mô hình thử nghiệm vắc xin cao hơn các ao/lồng nuôi đối chứng từ 17% - 25%.

Bảng 3. Kết quả thử nghiệm vắc xin ở mô hình thực địa

Loại hình nuôi	Vắc xin		Đối chứng không sử dụng vắc xin	
	RPS (%)	Tỷ lệ tăng trọng bình quân/tháng (%)	RPS (%)	Tỷ lệ tăng trọng bình quân/tháng (%)
Mô hình nuôi lồng trên biển	65	125	35	100
Mô hình nuôi trong ao đất	72	117	38	100

4. KẾT LUẬN

Bước đầu nghiên cứu đã chế tạo thành công vắc xin vô hoạt phòng bệnh hoại tử thần kinh trên cá mú trong điều kiện phòng thí nghiệm. Chúng vi rút TB05 được gây bất hoạt bằng beta - propiolactone nồng độ 0,1% và phối trộn với chất bổ trợ là nhôm hydroxit đã an toàn với cá thí nghiệm và hiệu quả bảo hộ trên 75% với cá mú giống đồng thời tỷ lệ sống ở các mô hình thử nghiệm tăng 30% - 34%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Badi'n I, Souto S. (2020). Betanodavirus and VER disease: a 30 - year research review. *Pathogens*, 9, p. 106.
2. C. Lin, J H-Y. Lin, M S. Chen, H L Yang (2007). An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*, 268, pp. 265 - 273.
3. Hu'sgar S, Grotmol S, Hjeltne B. K, Rødseth O. M, Biering E. (2001). Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45, pp. 33 - 44.
4. Jia P, Jia K. T and Yi M. S. (2015). Complete genome sequence of a fish nervous necrosis virus isolated from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) in China. *Genome Announcements*, 3, e00048 -15.

5. Kai Y-H., Chi S-C. (2008). Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization. *Vaccine*, 26, pp. 1450 - 1457.

6. K. Yuasa, I. Koesharyani, D. Roza, K. Mori, M. Katata, T. Nakai (2002). Immune response of humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes) injected with the recombinant coat protein of betanodavirus. *Journal of Fish Diseases*, 25, pp. 53 - 56.

7. Lorenzen N, Lorenzen E, Einer - Jensen K, Heppell J, Davis HL (1999). Genetic vaccination of rainbow trout against viral haemorrhagic septicaemia virus: small amounts of plasmid DNA protect against a heterologous serotype. *Virus Res* 63 (1 - 2): 19 - 25.

8. Mu Y, Lin K, Chen X and Ao J. (2013). Diagnosis of nervous necrosis virus in orange - spotted grouper, *Epinephelus coioides* by a rapid and convenient RT - PCR method. *Acta Oceanologica Sinica*, 32, 88 - 92.

9. Muniesa A, Basurco B, Aguilera C, Furones D, Reverte', Sanjuan - Vilaplana A, Jansen M. D, Brun E, Tavoranpanich S. (2020). Mapping the knowledge of the main disease affecting sea bass and sea bream in Mediterranean. *Transbound. Emerg. Dis*, pp. 1 - 12.

10. Pakingking Jr R, Bautista N. B, de Jesus - Ayson E. G, Reyes O (2010). Protective immunity

against viral nervous necrosis (VNN) in brown - marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) following vaccination with inactivated betanodavirus. *Fish & Shellfish Immunology*, 28, pp. 525 - 533.

11. Pascoli F, Serra M, Toson M, Pretto T and Toffan A. (2016). Betanodavirus ability to infect juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax* at different water salinity. *Journal of Fish Diseases*, 39 (9), 1061 - 1068.

12. Peducasse S, Castric J, Thierry R, Jeffroy J, Le Ven A. and Baudin Laurencin F. (1999). Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36, 11 - 20.

13. Reed L. J, Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 27: 493 - 497.

14. Sommerset R, Skern E, Biering H, Bleie I, Fiksdal U, Grove S (2005). Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not

following DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology*, 18, pp. 13 - 29.

15. Tanaka S, Mori K, Arimoto M, Iwamoto T, Nakai T (2001). Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *Journal of Fish Diseases*, 24, pp.15 - 22.

16. Thierry R, Cozien J, Cabon J, Lamour F, Baud M, Schneemann A (2006). Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus like particles. *J Virol* 80 (20): 10201 - 10207.

17. Yamashita H, Mori K, Kuroda A, Nakai T (2009). Neutralizing antibody levels for protection against betanodavirus infection in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg), immunized with an inactivated virus vaccine. *Journal of Fish Diseases*, 32, pp. 767 - 775.

18. Vimal S, Madan N, Farook M, Nambi K, Majeed S. A, Rajkumar T. (2014). Production of recombinant vaccine using capsid gene of nodavirus to protect Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *Aquaculture*, 418, pp. 148 - 154.

DEVELOPMENT AN INACTIVATED VACCINE TO PREVENT NERVOUS NECROSIS DISEASE IN GROUPER (*Epinephelus* sp.) IN ALABORATORY SCALE

Man Hong Phuoc^{1,2}, Pham Thi Tam², Dong Van Quyen¹, Vu Thi Bich Huyen³, Le Minh Hai⁴

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Ha Noi Open University

³Hanoi National University of Education

⁴Vinh University

Summary

Nervous necrosis is an acute disease that causes mass mortality of grouper in the juvenile, fingerlings adult stages. This paper showed the results of a research to develop an inactivated vaccine to prevent nervous necrosis disease for farmed grouper in a laboratory scale. TB05, a virus strain causing nervous necrosis disease was isolated from Thai Binh province, was selected as the strain for development of an inactivated vaccine; the virulence of strain TB05 on cells and fingerlings is $TCID_{50} = 10^{6.8}$ and $LD_{50} = 10^{7.5}$, respectively. The vaccine was produced by growing strain TB05 in GS01 cells and then inactivated with beta - propiolactone 0.1% and adsorbed with aluminum hydroxide. By the immersion method, vaccine was safe for grouper from larvae stage to fingerlings 1.5 cm in length. The relative protection rate of vaccine reached 75% with the challenge dose 0.2 x $TCID_{50}$, 0.5 x $TCID_{50}$ and 1 x $TCID_{50}$. This results provide a scientific basis for the production of vaccine to prevent grouper from nervous necrosis disease, helping to sustainably develop grouper farming in Vietnam.

Keywords: Vaccines, nervous necrosis disease, challenge dose, prevent, grouper.

Người phản biện: TS. Nguyễn Thị Thanh Thùy

Ngày nhận bài: 4/01/2022

Ngày thông qua phản biện: 8/02/2022

Ngày duyệt đăng: 15/02/2022