Tạp chí Công nghệ Sinh học 18(3): 477-485, 2020

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG BẢO HỘ CỦA GÀ ĐƯỢC TIÊM CHỦNG KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP HAEMAGGLUTININ DUNG HỢP IgMFc CÓ NGUỒN GỐC TỪ THỰC VẬT

Phạm Thị Vân[1, 2], Hồ Thị Thương[1], Nguyễn Thu Giang[1], Phạm Bích Ngọc[1,2], Vũ Huyền Trang[1,2], Phan Trọng Hoàng[3], Trần Xuân Hạnh[4], Udo Conrad[3], Chu Hoàng Hà[1,2,✉]

[1]*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*
[2]*Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*
[3]*Viện nghiên cứu cây trồng và di truyền thực vật (IPK), Gatersleben, Cộng hòa Liên bang Đức*
[4]*Công ty Cổ phần thuốc thú y Trung ương NAVETCO, Việt Nam*

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: chuhoangha@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 11.10.2019
Ngày nhận đăng: 20.8.2020

TÓM TẮT

Tiêm phòng vaccine là một biện pháp hiệu quả bảo vệ vật nuôi chống lại virus cúm A/H5N1. Haemagglutinin (HA) là một glycoprotein màng của virus A/H5N1 và là một kháng nguyên quan trọng trong phát triển vaccine phòng bệnh cúm. Vaccine dựa vào HA được sản xuất ở thực vật đã được chứng minh là có khả năng kích thích sản sinh kháng thể trung hòa. Nghiên cứu này trình bày các kết quả gây đáp ứng miễn dịch trên gà của kháng nguyên HA oligomer (H5TG oligomer, được tạo thành do sự dung hợp kháng nguyên H5TG trimer với motif IgMFc) có nguồn gốc từ thực vật và đánh giá khả năng bảo hộ gà bằng thí nghiệm công cường độc với chủng virus A/duck/TG/NAVET(3)/2013 clade 1.1. Các huyết thanh của gà sau mỗi lần tiêm được phân tích bằng phương pháp Western blot, ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent assay) và phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (haemagglutinin inhibition, HI). Kết quả phân tích cho thấy, kháng nguyên H5TG oligomer đã kích thích sản sinh kháng thể IgY đặc hiệu HA và kháng thể trung hòa virus cao hơn so với kháng nguyên H5TG trimer không dung hợp IgMFc. Tỷ lệ bảo hộ gà của kháng nguyên H5TG oligomer đạt 80%, trong khi tỷ lệ bảo hộ gà của kháng nguyên H5TG trimer chỉ đạt 50%. Đáng chú ý là tỷ lệ bảo hộ gà của kháng nguyên H5TG oligomer thấp hơn không đáng kể so với tỷ lệ bảo hộ gà của vaccine thương mại (90%) do Công ty CP thuốc thú y trung ương (NAVETCO) sản xuất. Kết quả này mở ra triển vọng cho việc ứng dụng kháng nguyên HA dung hợp IgMFc để tạo kháng nguyên HA tái tổ hợp dạng oligomer có nguồn gốc từ thực vật trong nghiên cứu sản xuất vaccine phòng bệnh cúm trong tương lai.

Từ khoá: *Haemagglutinin, kháng nguyên tái tổ hợp, tiêm chủng, công cường độc virus, kháng thể trung hòa, tỷ lệ bảo hộ.*

MỞ ĐẦU

Cúm gia cầm thể độc lực cao (Highly Pathogenic Avian Influenza - HPAI) do virus cúm A/H5N1 gây ra là bệnh truyền nhiễm cấp tính có tốc độ lây lan nhanh và tỷ lệ gây chết cao trong đàn gia cầm bị bệnh. Kể từ khi xuất hiện lần đầu tiên vào năm 1996 cho đến nay, virus cúm A/H5N1 thể độc lực cao đã gây ra nhiều vụ đại dịch ở nhiều nước trên thế giới, trong đó Việt Nam là điểm nóng với số ổ dịch bùng phát cao nhất trên thế giới. Dịch cúm gia cầm liên tục tái phát hàng năm với tốc độ lây lan nhanh và diễn biến phức tạp. Đặc biệt, chủng virus cúm A/H5N1 còn có thể xâm nhiễm gây bệnh ở người với tỉ lệ tử vong rất cao và đang trở thành mối đe

dọa nguy hiểm cho sức khỏe cộng đồng. Theo thống kê từ năm 2003 đến tháng 7 năm 2019, tại Việt Nam có trên 2780 điểm bùng phát dịch cúm do virus A/H5N1 ở hầu hết các tỉnh, thành phố, khiến hàng chục triệu gia cầm bị chết hoặc bị thiêu hủy, đặc biệt nghiêm trọng là có 127 trường hợp lây nhiễm bệnh ở người và số người tử vong là 64 người (OIE, 2019; WHO, 2019). Theo thống kê, tính tới 06/09/2017 thiệt hại về mặt kinh tế lên tới 1,8% GDP quốc gia (FAO, 2020).

Virus cúm A thuộc họ Orthomyxoviridae (Swayne & Suarez, 2000). Hệ gen virus cúm A là RNA sợi đơn âm, gồm 8 phân đoạn gen riêng biệt, mã hóa cho 11 protein khác nhau của virus, các phân đoạn được sắp xếp theo trật tự: PB2, PB1 (PB1 và PB1-F2), PA, HA, NP, NA, M (M1 và M2), NS (NS1 và NS2). Trong đó, virus cúm A có thể được chia thành các subtype dựa vào sự khác nhau của hai kháng nguyên bề mặt là haemagglutinin (HA) và neuraminidase (NA) (Sfakianos, 2006). HA có chức năng giúp virus bám dính vào tế bào cảm thụ và làm xâm nhập vật liệu di truyền của virus vào bên trong tế bào. Các glycoprotein HA quyết định tính kháng nguyên đặc hiệu của từng loại virus khác nhau và cũng là vị trí để các loại thuốc kháng virus trong điều trị bệnh sẽ gắn kết và phát huy tác dụng diệt virus. Đồng thời HA còn có vai trò quan trọng trong việc quyết định tính kháng nguyên trong sản xuất vaccine (Klenk, 2015).

Vaccine là một biện pháp hiệu quả bảo vệ sức khỏe người và vật nuôi chống lại virus cúm A/H5N1 (Gerhard, 2001). Phát triển vaccine hiệu quả, an toàn với giá thành rẻ phòng chống lại virus cúm A là một mục tiêu nghiên cứu quan trọng. Việc sản xuất vaccine tái tổ hợp dựa vào HA sản xuất ở thực vật là một xu hướng thay thế quan trọng cho vaccine truyền thống (Shoji *et al.*, 2009, Kalthoff *et al.*, 2010; Floss, Conrad, 2012; Phan *et al.*, 2017; Pham *et al.*, 2017). Vaccine dựa vào HA được sản xuất ở thực vật dưới dạng trimer và oligomer đã được chứng minh là có khả năng kích thích sản sinh kháng thể trung hòa trên động vật được tiêm chủng (Phan *et al.*, 2013; Phan *et al.*, 2017).

Hiện nay, việc nghiên cứu tạo protein HA tái tổ hợp của virus A/H5N1 dạng oligomer là vấn đề mới được nhiều nhà khoa học quan tâm. Với mục tiêu tạo protein HA tái tổ hợp của virus A/H5N1 dạng oligomer, trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã dung hợp gen mã hóa protein HA (H5TG) có nguồn gốc từ virus A/duck/Vietnam/TG24-01/2005 với GCN4pII-IgMFc để tạo ra protein tái tổ hợp H5TGpII-IgMFc (H5TG oligomer). Protein H5TGpII-IgMFc tiếp đó đã được biểu hiện tạm thời trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*. Bước đầu phân tích đặc điểm cấu trúc và hoạt tính sinh học cho thấy, protein H5TGpII-IgMFc có tồn tại dạng oligomer và hàm lượng protein H5TG oligomer nhỏ nhất để gây ngưng kết tế bào hồng cầu gà (1 HAU) là 0,06 µg thấp hơn nhiều so với protein H5TG trimer (là 0,24 µg). Điều này cho thấy việc dung hợp IgMFc vào protein H5TG đã tạo được trạng thái oligomer của H5TG với hoạt tính ngưng kết hồng cầu mạnh hơn so với protein H5TG không dung hợp với IgMFc. Kết quả đã mở ra khả năng ứng dụng motif IgMFc trong việc tạo oligomer khi dung hợp với các protein khác nhằm tăng cường hoạt tính sinh học của protein đích trong nghiên cứu tạo vaccine tái tổ hợp (Pham *et al*., 2020).

Để tiếp tục hướng nghiên cứu trên, trong nghiên cứu này, hoạt tính sinh học của protein tái tổ hợp H5TG oligomer đã được đánh giá *in vivo* trên gà. Đầu tiên, protein tái tổ hợp được gây đáp ứng miễn dịch trên gà. Tiếp đến, khả năng bảo hộ trên gà của protein H5TG tái tổ hợp được đánh giá khi công cường độc với virus cúm A/duck/TG/NAVET(3)/2013 clade 1.1. Ngoài ra, kháng thể trung hòa và kháng thể IgY đặc hiệu HA trong huyết thanh gà đã được đánh giá bằng phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu, phản ứng Western blot và ELISA.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Kháng nguyên haemagglutinin

Protein haemagglutinin có (H5TG oligomer) và không dung hợp IgMFc (H5TG trimer) đã được tinh sạch mỗi loại, có nguồn gốc sản xuất trên thuốc lá biến nạp tạm thời và được cung cấp bởi Phòng

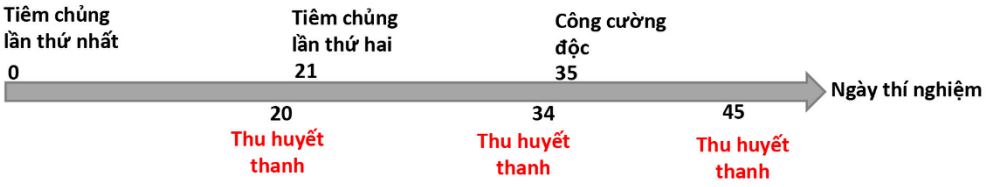
Công nghệ tế bào thực vật và Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học.

Gà thí nghiệm, chủng virus công cường độc

Gà thí nghiệm và chủng virus công cường độc được chuẩn bị theo tiêu chuẩn của Công ty NAVETCO. Gà giống 3 tuần tuổi chưa được tiêm vaccine cúm gia cầm hoặc chưa bị nhiễm tự nhiên với virus cúm gia cầm và có huyết thanh âm tính với kháng thể H5N1. Chủng virus cho công cường độc là A/duck/TG/NAVET(3)/2013 thuộc clade 1.1.

Thí nghiệm miễn dịch trên gà

Có 4 nhóm thí nghiệm, mỗi nhóm thí nghiệm sử dụng 10 con gà đã được 3 tuần tuổi, bao gồm hai nhóm thí nghiệm chứa kháng nguyên HA tái tổ hợp H5TG oligomer và H5TG trimer (10 µg kháng nguyên HA/con gà), hai nhóm đối chứng gồm vaccine NAVETCO – nhóm đối chứng dương sử dụng vaccine Navet-Vifluvac và PBS – nhóm đối chứng âm, là đệm PBS (100 mM NaCl, 32 mM Na_2HPO_4, 17 mM NaH_2PO_4, pH 7,2) không chứa kháng nguyên HA tái tổ hợp. Gà sẽ được tiêm 2 lần với các nhóm kháng nguyên tương ứng, mỗi lần tiêm 0,5 mL/gà (như được mô tả trong Hình 1). Lần tiêm chủng thứ nhất cách lần tiêm chủng thứ hai là 3 tuần. Một ngày trước khi tiêm chủng lần thứ hai và trước công cường độc, huyết thanh của gà ở tất cả các nhóm được thu thập để phân tích Western blot, ELISA và HI (gọi là huyết thanh trước công). Hai tuần sau khi tiêm chủng lần thứ hai, gà ở tất cả các nhóm thí nghiệm được công cường độc với chủng virus A/duck/TG/NAVET(3)/2013 clade 1.1. Liều công từ 10^6-$10^{6,5}$ ELD_{50} cho mỗi con bằng cách nhỏ mắt. Gà sẽ được theo dõi trong vòng 10 ngày. Ở ngày 10, lấy máu gà sống để đo hàm lượng kháng thể trung hòa bằng phản ứng HI (gọi là huyết thanh sau công cường độc). Theo dõi sự sống, chết của từng con gà trong tất cả các nhóm trong vòng 10 ngày sau khi công cường độc.



Hình 1. Mô hình thí nghiệm tiêm chủng và công cường độc trên gà

Phản ứng Western blot và ELISA gián tiếp

Để phát hiện kháng thể IgY đặc hiệu H5TG trong huyết thanh của gà gây miễn dịch, Western blot đã được thực hiện. Protein H5TG tinh sạch bởi SEC (700 ng) được phân tách trên 10 giếng của gel SDS-PAGE biến tính (polyacrylamide 10%) và tiếp đó được chuyển lên màng nitrocellulose ở 22 V, qua đêm. Sau đó, màng được khóa bằng bột sữa không béo 5% (w/v) hòa tan trong dung dịch đệm PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4, pH 7,4). Sau 2 giờ, mỗi làn của màng được tách biệt bằng cách cắt và ủ ở nhiệt độ phòng trong 90 phút với độ pha loãng 1 : 20 của hỗn hợp huyết thanh từ 10 con gà của mỗi nhóm thí nghiệm sau lần tiêm chủng thứ nhất và thứ hai. Tiếp theo, các màng được ủ với độ pha loãng 1 : 5000 của kháng thể 2 kháng IgY của gà (Anti-chicken IgY (whole molecule) Alkaline phosphatase antibody) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Các tín hiệu được phát hiện bằng cách ủ màng với 3,3-diaminobenzidine (DAB), hòa tan trong 0,05 M Tris và 0,04% hydro peroxide trong 10 phút trong bóng tối.

ELISA gián tiếp dựa trên phương pháp được mô tả bởi Phạm Bích Ngọc và cộng sự (2017) có cải tiến. Đầu tiên, 100 ng của H5TG đã được tinh sạch bằng phương pháp SEC (size exclusion chromatography) trước đó sẽ được thêm vào các giếng của đĩa microtitre 96 giếng (ImmunoPlateMaxisorp, hãng Nalgen Nunc) và ủ ở nhiệt độ phòng qua đêm. Các giếng sau đó

được khóa bằng albumin huyết thanh bò 3% (w/v) (BSA) và 0,05% (v/v) Tween20 trong PBS (PBST) trong 2 giờ. Tiếp theo, 100 µL huyết thanh gà tiêm chủng với độ pha loãng 1000 lần được bổ sung lên mỗi giếng và ủ trong 1 giờ ở 25 °C. Mỗi độ pha loãng huyết thanh được lặp lại bốn lần. Các giếng này được rửa 5 lần bằng PBST và sau đó được ủ với 100 µL kháng thể 2 kháng IgY của gà (kháng thể 2 đã được pha loãng 35000 lần trong 1% (w/v) BSA) trong PBST trong 1 giờ ở 25 °C. Sau đó, 100 µL dung dịch diethanolamine-HCl 0,1M (pH 9,8) có chứa cơ chất enzyme là p-nitrophenyl phosphate (pNPP) được bổ sung vào và ủ ở nhiệt độ 37 ^{o}C trong 1 giờ. Tất cả huyết thanh gà của tất cả các đĩa được đo trong cùng điều kiện ELISA. Tín hiệu độ hấp thụ được xác định ở 405 nm. Các giá trị ELISA của mỗi giếng kiểm tra huyết thanh gà được trừ đi đối chứng âm BSA ở pha rắn. Các giá trị ELISA của tất cả huyết thanh gà đã được chuẩn hóa bằng cách sử dụng huyết thanh kiểm soát nội bộ của gà con số 1 của nhóm 1 sau 2 lần tiêm chủng với độ pha loãng 1000 lần.

Phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (haemagglutination inhibition, HI)

Các thí nghiệm HI theo một quy trình chuẩn của Office International des Epizooties (OIE) từ năm 2004 (OIE, 2004). Kháng nguyên chủng A/H5N1 clade 1.1 bất hoạt (NAVETCO) đã được sử dụng cho thí nghiệm HI. Một lượng huyết thanh 25 µL từ một con gà đã được thêm vào giếng đầu tiên của một đĩa microtitre đáy chữ V chứa 25 µL PBS. Pha loãng nối tiếp hai lần sau đó được thực hiện trên hàng 12 giếng. Một thể tích 25 µL chứa 4 HAU của protein HA tinh khiết hoặc các chủng bất hoạt dị hợp được đưa vào từng giếng và ủ trong 30 phút ở 25 °C. Cuối cùng, 25 µL tế bào hồng cầu gà 1% được bổ sung vào mỗi giếng và các đĩa được ủ trong 30 phút ở 25 °C. Hiệu giá HI được định nghĩa là sự đối ứng của độ pha loãng cao nhất của huyết thanh có thể ức chế hoàn toàn quá trình ngưng kết tế bào hồng cầu.

Phân tích thống kê và tính tỷ lệ bảo hộ

Các phân tích thống kê cho ELISA và HI được thực hiện bằng t-test. Sự khác biệt giữa giá trị trung bình của dữ liệu mẫu được so sánh và được xác định là X ± độ lệch chuẩn (SD). Giá trị $P < 0,05$ được xem là có sự khác biệt có ý nghĩa. Tỷ lệ bảo hộ là số gà sống sót trên tổng số gà thí nghiệm sau khi công cường độc.

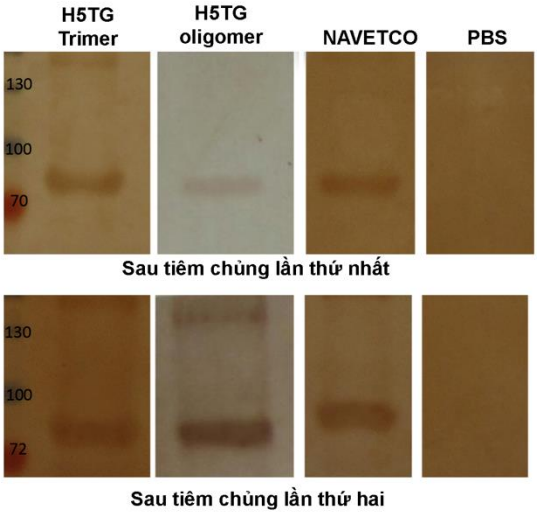
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phát hiện kháng thể IgY đặc hiệu H5TG bằng phản ứng Western blot và ELISA gián tiếp

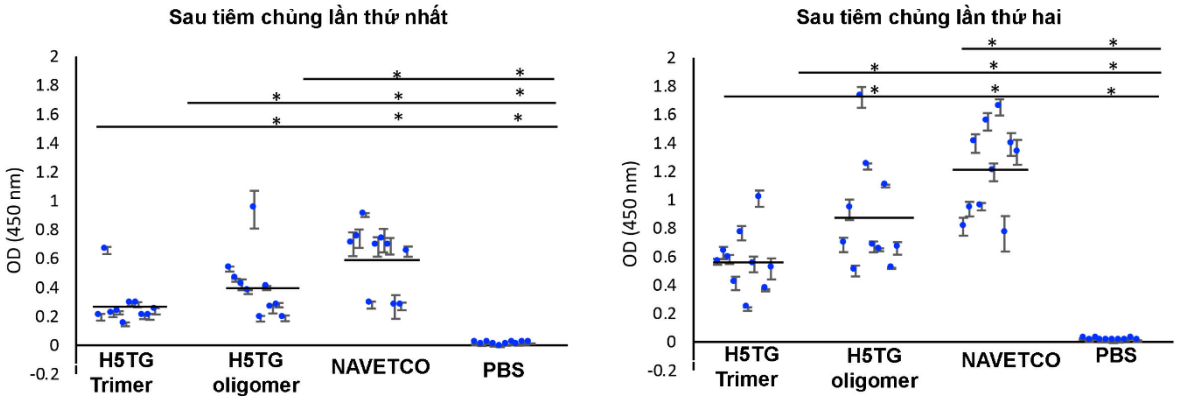
Khả năng miễn dịch của kháng nguyên H5TG tái tổ hợp đã được kiểm tra bằng cách tiêm chủng cho gà. Các phản ứng miễn dịch thể dịch phụ thuộc kháng thể IgY chống lại protein H5TG được phân tích đầu tiên bởi SDS-PAGE biến tính và Western blot (Hình 2). Các huyết thanh gà được thu thập sau khi tiêm chủng lần thứ nhất và thứ hai của mỗi nhóm được trộn lẫn và được sử dụng làm kháng thể thứ nhất. Kết quả phân tích cho thấy các kháng thể IgY đặc hiệu chống lại protein H5TG đã được phát hiện sau các lần tiêm chủng. Trong đó, sau lần tiêm chủng thứ hai, tín hiệu băng Western blot mạnh hơn nhiều có thể thấy rõ so với lần tiêm chủng thứ nhất ở các nhóm tiêm chủng bởi kháng nguyên H5TG oligomer, H5TG trimer và vaccine NAVETCO. Điều này chứng tỏ đáp ứng miễn dịch đã được tăng cường sau lần tiêm chủng thứ hai. Còn gà đối chứng âm được tiêm chủng là đệm PBS, không có phản ứng kháng thể IgY đặc hiệu H5TG được tạo ra.

ELISA là một trong những xét nghiệm miễn dịch phổ biến nhất được sử dụng để phát hiện và định lượng kháng nguyên hoặc kháng thể đích, trong đó các phản ứng enzyme được sử dụng để khuếch đại tín hiệu nếu có chất đích đó (O'Connor, 2015). Trong nghiên cứu này, các phản ứng miễn dịch trong huyết thanh của gà trong mỗi nhóm được xác định bằng ELISA gián tiếp. Các huyết thanh mỗi con gà trong mỗi nhóm tiêm chủng được xác định và so sánh bằng phân tích thống kê hàm t-test. Kết quả phân tích thể hiện trên Hình 3 cho thấy, giá trị trung bình OD_{405} của huyết thanh gà nhóm tiêm chủng bởi kháng nguyên H5TG oligomer cao hơn một cách có ý nghĩa so với nhóm tiêm chủng bởi kháng nguyên H5TG trimer và thấp hơn so với nhóm đối chứng dương vaccine NAVETCO ở cả 2 lần sau tiêm chủng thứ nhất và thứ hai ($P<0,05$).

Sau cả hai lần tiêm chủng, không có phản ứng miễn dịch chống lại protein H5TG được phát hiện trong huyết thanh gà đối chứng âm từ những con gà được tiêm chủng PBS.



Hình 2. Phân tích Western blot của huyết thanh gà phát hiện kháng thể IgY đặc hiệu H5TG sau tiêm chủng lần thứ nhất và lần thứ hai.

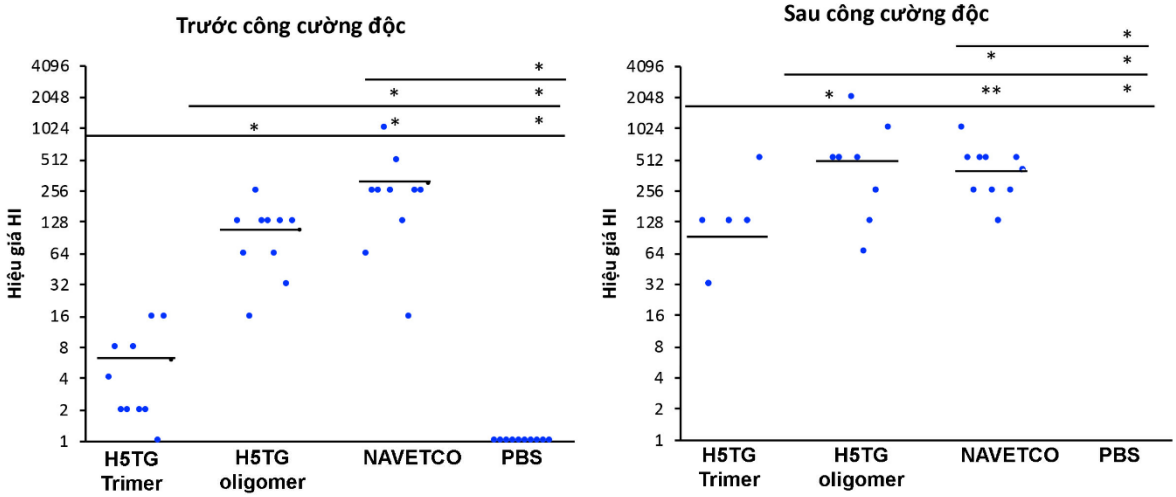


Hình 3. Phân tích ELISA của huyết thanh gà phát hiện kháng thể IgY đặc hiệu H5TG sau tiêm chủng lần thứ nhất và lần thứ hai. Mỗi dấu chấm trên hình là giá trị trung bình của 4 lần lặp lại ELISA ở độ pha loãng 1/1000 với thanh dọc thể hiện cho độ lệch chuẩn. Các giá trị được phân tích thống kê bằng t-test với (*) tương ứng với giá trị P < 0,05. Thanh ngang mỗi nhóm biểu diễn cho giá trị trung bình của mỗi nhóm thí nghiệm.

Phát hiện kháng thể trung hòa trong huyết thanh gà bằng thí nghiệm HI

Các thí nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (HI) thường sử dụng để đo các kháng thể trung hòa được tạo ra trong huyết thanh sau khi tiêm chủng bằng virus bất hoạt A/H5N1 hoặc kháng nguyên HA. Kháng thể trung hòa được tạo ra sẽ liên kết với thụ thể của haemagglutinin của virus A/H5N1dẫn đến ngăn chặn virus gắn vào thụ thể sialic acid và làm kết tụ các tế bào hồng cầu gà (Phan, 2012). Trong nghiên cứu này, phản ứng HI sử dụng chủng virus bất hoạt A/H5N1 clade 1.1 để xác định kháng thể trung hòa được tạo ra trong huyết thanh gà trước khi công cường độc 1 ngày và sau khi công cường độc virus 10 ngày. Các kết quả được hiển thị trong Hình 4 cho thấy, hiệu giá HI trung bình của huyết thanh gà trong nhóm gà được tiêm chủng với các

kháng nguyên H5TG trimer, H5TG oligomer và đối chứng dương vaccine NAVETCO lần lượt là 6,10 ± 5,78; 107,10 ± 68,29 và 302,40 ± 287,65 trước khi công cường độc 1 ngày; và 92,70 ± 62,20; 505,60 ± 638,40 và 396,80 ± 300,19 sau công cường độc 10 ngày. Trong khi đó, hiệu giá HI của huyết thanh gà trong nhóm đối chứng âm đạt 1 trước khi công và sau khi công tất cả gà nhóm âm tính đều chết nên không thực hiện được phản ứng HI. Như vậy, kháng thể trung hòa đã được tạo ra trong huyết thanh gà của nhóm được tiêm chủng bởi kháng nguyên H5TG oligomer mạnh hơn so với nhóm được tiêm chủng bởi kháng nguyên H5TG trimer.



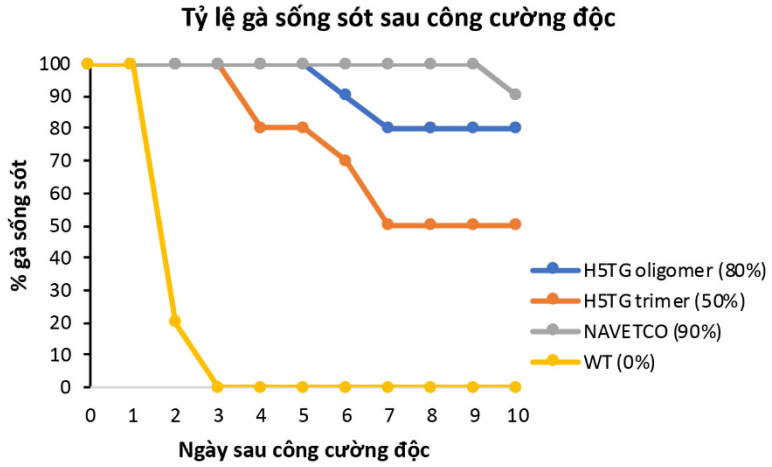
Hình 4. Phân tích HI của huyết thanh gà để phát hiện kháng thể trung hòa đặc hiệu H5TG sau tiêm chủng lần thứ nhất và lần thứ hai. Mỗi dấu trên hình là giá trị HI của mỗi con gà. Các giá trị được phân tích thống kê bằng t-test với (*) và (**) tương ứng với giá trị P < 0,05 và P > 0,05. Thanh ngang mỗi nhóm biểu diễn cho giá trị HI trung bình của mỗi nhóm.

Phân tích tỷ lệ bảo hộ của kháng nguyên H5TG tái tổ hợp đối với virus A/H5N1 clade 1.1

Để đánh giá hiệu quả của các kháng nguyên HA nghiên cứu, tỷ lệ bảo hộ là một trong những chỉ số cho thấy kháng nguyên đó có thể trở thành một ứng cử viên cho sản xuất vaccine hay không. Các nhóm gà được tiêm chủng đã được công cường độc chủng virus A/duck/TG/NAVET(3)/2013 thuộc clade 1.1. Tất cả các con gà ở nhóm đối chứng âm đều chết sau 1 đến 3 ngày công cường độc. Các con gà được tiêm chủng bởi kháng nguyên H5TG oligomer và H5TG trimer không chết sau 3 ngày công cường độc. Sau 10 ngày công cường độc, 8/10 (tỷ lệ bảo hộ là 80%) con gà được tiêm chủng bởi kháng nguyên H5TG oligomer sống sót và hai con gà của nhóm này bị chết ở ngày thứ sáu và bảy sau khi công cường độc virus; trong khi chỉ 5/10 (tỷ lệ bảo hộ là 50%) con gà sống sót khi tiêm chủng bởi kháng nguyên H5TG trimer không dung hợp IgMFc và các con gà của nhóm này bị chết ở ngày thứ tư, năm, sáu và bảy sau công cường độc virus. So sánh với đối chứng dương NAVETCO (là vaccine thương mại Navet-Vifluvac, loại vaccine vô hoạt được sản xuất từ virus cúm A/H5N1 chủng NIBRG-14 bằng kỹ thuật di truyền ngược, nuôi cấy trên phôi trứng gà và bất hoạt bằng Formalin), có 9/10 (tỷ lệ bảo hộ là 90%) con gà sống sót (Hình 5). Điều này cho thấy kháng nguyên H5TG oligomer có tỷ lệ bảo hộ tương đối cao so với đối chứng dương và có tiềm năng để sử dụng làm nguồn vaccine phòng chống virus cúm A/H5N1 clade 1.1.

Việc dung hợp một motif nào đó vào protein đích có thể dẫn đến những thay đổi về cấu trúc và chức năng của protein đó. Trong những nghiên cứu trước đây, Phan Trọng Hoàng đã thiết kế một cấu trúc kháng nguyên HA dạng monomer có dung hợp ELP. Báo cáo đã cho thấy kháng nguyên HA-ELP đã được biểu hiện mạnh hơn trong thuốc lá và kháng thể IgY đặc hiệu HA

đã được phát hiện trong huyết thanh gà nhưng kháng thể trung hòa không được tạo ra vì tất cả các con gà đều bị chết ở hai ngày sau công cường độc, ngoại trừ có 1 con gà chết sau ba ngày công (Phan, 2012). Tiếp đó, HA dạng homotrimer là dạng giống với cấu trúc HA tự nhiên cũng đã được tạo ra bằng cách gắn motif GCN4 vào HA có dung hợp ELP (H5pII trimer ELP hoá) và không dung hợp ELP (H5pII trimer). Cả hai cấu trúc HA timer này đều đã được chứng minh có khả năng sinh ra kháng thể trung hoà kháng virus đồng chủng và cả dị chủng trên chuột thí nghiệm (Phan *et al.*, 2013). Hiệu giá HI trung bình của nhóm kháng nguyên H5pII trimer cao hơn nhóm kháng nguyên H5pII trimer ELP hóa khi kiểm tra HI sau 3 lần tiêm chủng (Phan *et al.*, 2013). Những nghiên cứu tiếp đó cũng đã chứng minh rằng HA oligomer sẽ làm tăng cường tính sinh miễn dịch của HA trong động vật so với HA trimer (Phan *et al.*, 2017; Pham *et al.*, 2017; Phạm Thị Vân *et al.*, 2020). Đặc biệt, kháng nguyên H5TG oligomer được tạo ra bằng cách dung hợp HA trimer với tiểu phần Fc của kháng thể IgM (gọi tắt là IgMFc) đã được chứng minh là có cấu trúc protein biểu hiện trong thực vật dạng oligomer và hoạt tính ngưng kết hồng cầu của nó cao hơn so với HA trimer không gắn với IgMFc. Sự hình thành cấu trúc H5TG oligomer là do các liên kết disulfide trong motif IgMFc tạo thành các cầu nối giữa các HA trimer lại với nhau (Phạm Thị Vân *et al.*, 2020). Trong nghiên cứu này, kháng nguyên H5TG oligomer tiếp tục được báo cáo những kết quả trong đánh giá tính sinh miễn dịch và khả năng bảo hộ trên gà thí nghiệm. Đây là bước quan trọng nhất để đánh giá xem liệu kháng nguyên này có tiềm năng cho sử dụng làm vaccine phòng bệnh cúm hay không. Phân tích đã cho thấy, kháng nguyên H5TG oligomer tạo ra từ việc dung hợp HA trimer với IgMFc đã kích thích khả năng sản sinh kháng thể IgY đặc hiệu và kháng thể trung hòa bảo vệ gà chống lại virus A/H5N1 clade 1.1 mạnh hơn nhiều so với kháng nguyên HA dạng trimer không dung hợp IgMFc. Đặc biệt, khả năng bảo hộ gà sau thí nghiệm công cường độc của kháng nguyên H5TG oligomer (80%) thấp hơn không đáng kể so với vaccine thương mại của công ty NAVETCO (90%). Kết quả này là một trong những bước phát triển mới đầy hứa hẹn trong việc tạo vaccine cúm tiểu đơn vị có nguồn gốc từ thực vật và mở ra hướng phát triển vaccine mới ở nước ta.



Hình 5. Tỷ lệ gà sống sót sau công cường độc với chủng A/duck/TG/NAVET (3)/2013.

KẾT LUẬN

Kháng nguyên H5TG oligomer đã kích thích sản sinh kháng thể IgY đặc hiệu H5TG và kháng thể trung hòa virus cúm A/H5N1 clade 1.1 khi được gây miễn dịch trên gà thí nghiệm. Tỷ lệ bảo hộ gà của kháng nguyên H5TG oligomer trong thí nghiệm công cường độc với virus cúm A/duck/TG/NAVET (3)/2013 clade 1.1 đạt 80% đã mở ra triển vọng ứng dụng kháng nguyên

H5TG oligomer này trong nghiên cứu sản xuất vaccine tiểu đơn vị có nguồn gốc thực vật phòng bệnh cúm A/H5N1 trên gia cầm trong tương lai.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu được sự hỗ trợ kinh phí của Bộ Khoa học và Công nghệ trong đề tài "Nghiên cứu sản xuất kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1 có tính sinh miễn dịch cao bằng phương pháp biểu hiện tạm thời trên cây thuốc lá", mã số NĐT.07.GER.15 được thực hiện tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam với sự hợp tác cùng Viện nghiên cứu cây trồng và di truyền thực vật (IPK), Gatersleben, CHLB Đức. Kết quả là một phần trong luận án của nghiên cứu sinh Phạm Thị Vân tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

FAO (2020). FAO in Viet Nam. 5000 ngày chiến đấu với cúm gia cầm tại Việt Nam. http://www.fao.org/vietnam/news/detail/vn/c/1038732/

Floss DM, Conrad U (2012) Plant molecular pharming – veterinary applications. In: Meyers R A (Ed.): Encyclopedia of sustainability science and technology. *Springer* 11: 8073-8080.

Gerhard W (2001) The role of the antibody response in influenza virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 260: 171-190.

Kalthoff D, Giritch A, Geisler K, Bettmann U, Klimyuk V, Hehnen HR, Gleba Y, Beer M (2010) Immunization with plant-expressed hemagglutinin protects chickens from lethal highly pathogenic avian influenza Virus H5N1 challenge infection. *J Virol* 84: 12002-12010.

Klenk HD (2015) Influenza viruses en route from birds to man. *Cell Host Microb* 15(6): 653-4.

O'Connor TP (2015) SNAP assay technology. *Top Companion Anim Med* 30: 132-8. DOI: 10.1053/j.tcam.2015.12.002.

Office International des Epizooties (OIE) - World Organization for Animal Health (2004) Highly pathogenic avian influenza, in manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds, and bees). 258–269. http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/.

Office International des Epizooties (OIE) - World Organization for Animal Health (2019) Update on avian influenza in animals. http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/.

Pham NB, Ho TT, Nguyen GT, Le TT, Le NT, Chang HC, Pham MD, Conrad U, Chu HH (2017) Nanodiamond enhances immune responses in mice against recombinant HA/H7N9 protein. *J nanobiotechnology* 15: 69, doi:10.1186/s12951-017-0305-2.

Pham Thi Van, Phan Trong Hoang, Ho Thi Thuong, Nguyen Thu Giang, Pham Bich Ngoc, Vu Huyen Trang, Udo Conrad, Chu Hoang Ha (2020) Bio-functional enhancement of plant based-haemagglutinin by fusion with IgMFc. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 18(2).

Phan HT (2012) ELPylated avian flu vaccines from plants: Improvement of expression and development of a new purification strategy. Thesis of PhD, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), 02 October 2012.

Phan HT, Floss DM, Conrad U (2013) Veterinary vaccines from transgenic plants: highlights of two decades of research and a promising example. *Curr Pharm Design* 19: 5601-5611.

Phan HT, Ho TT, Chu HH, Vu TH, Gresch U, Conrad U (2017) Neutralizing immune responses induced by oligomeric H5N1-hemagglutinins from plants. *Vet Res* 48: 53, doi:10.1186/s13567-017-0458-x.

Phan HT, Pohl J, Floss DM, Rabenstein F, Veits J, Le BT, Chu HH, Hause G, Mettenleiter T, Conrad U (2013) ELPylated haemagglutinins produced in tobacco plants induce potentially neutralizing antibodies against H5N1 viruses in mice. *Plant Biotechnol J* 11: 582-593, doi:10.1111/pbi.12049.

Shoji Y, Bi H, Musiychuk K, Rhee A, Horsey A, Roy G, Green B, Shamloul M, Farrance CE, and Taggart B (2009) Plant-derived hemagglutinin protects ferrets against challenge infection with the A/Indonesia/05/05 strain of avian influenza. *Vaccine* 27: 1087-1092.

World Health Organization (WHO). Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2019. https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/2019_04_09_tableH5N1.pdf?ua=1.

Tạp chí Công nghệ Sinh học 18(3): 477-485, 2020

PROTECTION OF CHICKENS AGAINST A/H5N1 VIRUS BY PLANT-BASED HAEMAGGLUTININ FUSED IgMFc

Pham Thi Van[1, 2], Ho Thi Thuong [1,] Nguyen Thu Giang[1], Pham Bich Ngoc [1,2], Vu Huyen Trang [1,2], Phan Trong Hoang[3], Tran Xuan Hanh[4], Udo Conrad[3], Chu Hoang Ha [1,2]

[1]Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology
[2]Graduate of Science and technology, Vietnam Academy of Science and Technology
[3]Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany
[4]National Veterinary Joint Stock Company NAVETCO, Vietnam

SUMMARY

Vaccination is one of the most effective and cost-beneficial interventions for protection of animals against the highly pathogenic A/H5N1 avian influenza virus. Haemagglutinin (HA) is a transmembrane glycoprotein of A/H5N1 virus and is a critical antigen for development of the influenza vaccine. The haemagglutinin-based vaccine produced in plants was demonstrated as a candidate vaccine since it elicited neutralizing antibodies against A/H5N1 virus. In this study, immunogenicity and protective ability of a plant-based recombinant HA antigen which was fused to IgMFc to form oligomerized HA antigen (H5TG oligomer) had been evaluated by vaccination in chickens. Chicken sera after each vaccination were collected for Western blot, ELISA and HI assays. Ten days after the second vaccination, the chickens have been challenged with A/duck/TG/NAVET(3)/2013 virus, clade 1.1. The analysis results showed that the oligomeric recombinant H5TG antigen elicited stronger H5TG-specific IgY antibodies and A/H5N1 clade 1.1 virus-neutralizing antibodies than the H5TGpII trimeric recombinant antigen without fusing IgMFc in vaccinated chickens. Notably, the chicken protection rate against A/H5N1 clade 1.1 virus of the H5TG oligomer antigen was 80% that is not significantly lower than that of a commercial vaccine as a positive control from National Veterinary Joint Stock company NAVETCO, Vietnam with the chicken protective rate of 90%. Whereas the chicken protection rate against A/H5N1 clade 1.1 virus of the H5TG trimer antigen was 50%. These results suggest that the IgMFc motif plays an important role in the forming of oligomeric proteins which had been proved for enhancing immunogenicity and protection ability in this study. Therefore, the plant-based oligomerized recombinant H5TG antigen is a potential vaccine candidate against A/H5N1 influenza virus in the future.

Keywords: *Haemagglutinin, recombinant antigen, vaccination, virus challenge, neutralizing antibodies, protective rate.*