

TINH CHẾ KHÁNG THỂ IG_Y TỪ LÒNG ĐỎ TRỨNG GÀ VÀ ỨNG DỤNG TRONG PHÒNG VÀ TRỊ BỆNH GUMBORO TRÊN GÀ

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, Lê Văn Phan*

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: letranphan@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 27.12.2019

Ngày chấp nhận đăng: 24.02.2020

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là tinh chế kháng thể Ig_Y từ lòng đỏ trứng gà và ứng dụng để phòng và điều trị bệnh Gumboro trên gà. Gà mái giống ISA Brown 16 tuần tuổi được gây tối miễn dịch để tạo ra trứng có hiệu giá kháng thể cao. Kết quả nghiên cứu đáp ứng miễn dịch cho thấy kháng thể đặc hiệu kháng virus Gumboro tăng mạnh, đặc biệt là sau khi gây tối miễn dịch với virus cường độc vô hoạt. Hiệu giá kháng thể trong huyết thanh của gà đạt mức cao nhất sau 8 tuần tiêm vaccin (giá trị S/P là $2,86 \pm 0,068$). Tương tự, hiệu giá kháng thể trong lòng đỏ trứng cũng tăng, giá trị S/P của kháng thể Ig_Y là $2,56 \pm 0,11$, giá trị S/P của Ig_Y sau tinh chế từ lòng đỏ là $2,60 \pm 0,052$. Hiệu giá kháng thể ổn định trong điều kiện bảo quản ở 4°C và bổ sung 0,1% sodium benzoate. Kết quả điều trị gà khi gây bệnh thực nghiệm với virus Gumboro cho thấy việc sử dụng sản phẩm kháng thể Ig_Y tinh chế đem lại hiệu quả tốt trong phòng trị cho gà: 10/10 gà được tiêm kháng thể Ig_Y trước đó và 9/10 gà được điều trị bằng kháng thể Ig_Y sống sót sau khi tiêm virus gumboro cường độc, trong khi 9/10 gà lô đối chứng không được tiêm kháng thể đều bị chết.

Từ khoá: Bệnh Gumboro, Ig_Y tinh khiết, điều trị.

Purification of Ig_Y from Egg Yolk and Its Application for Prevention and Treatment of Gumboro Disease in Poultry

ABSTRACT

The objective of this study was to purify Ig_Y antibodies from chicken egg yolks and apply them for prevention and treatment of Gumboro disease in chickens. In this study, ISA Brown layers of 16 weeks old were used for hyper-immunization to produce eggs with high antibody titers. The immunization results showed that IBD antibody titer sharply increased, especially after hyper-immunizing. The highest titer in the serum samples was obtained at 8 weeks post first vaccination (S/P value was 2.86 ± 0.068). Similar with sera, titer of IBD antibody also raised in eggs, S/P value of Ig_Y-antibody was 2.56 ± 0.111 , S/P value of purified Ig_Y from the appropriate yolk was 2.60 ± 0.052 . The antibody titer of purified Ig_Y product was stable at 4°C with 0.1% sodium benzoate added. The treatment results of chickens that were experimentally infected with gumboro virus showed that 10/10 chickens previously received Ig_Y antibody and 9/10 chickens were treated with Ig_Y antibody after challenging gumboro virus were survived and recovered while 9/10 chickens in the control group that did not receive Ig_Y antibody before challenging test were died.

Keywords: Gumboro disease, purified Ig_Y, treatment.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Gumboro là một bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm, gây thiệt hại rất lớn cho chăn nuôi gà, cả ở quy mô công nghiệp cũng như quy mô hộ gia đình. Bệnh thường xảy ra ở các

đàn gà từ 10 ngày đến 60 ngày tuổi, song đa số các đàn gà mắc bệnh đều ở độ tuổi từ 15 đến 30 ngày. Tỷ lệ chết của gà khi bị nhiễm bệnh khoảng 3-20% nếu không ghép với các bệnh khác và 21-100% nếu nhiễm kèm với các bệnh khác gây ra bởi virus, vi khuẩn, ký sinh trùng.

Năm 1893, Klemperer lần đầu tiên mô tả việc gây miễn dịch cho gà tạo ra kháng thể đặc hiệu, các kháng thể này được truyền từ huyết thanh sang trứng. Kháng thể được truyền từ gà mẹ sang gà con qua giai đoạn tiềm ẩn của trứng và đóng một vai trò quan trọng trong chức năng miễn dịch cho gà con (khi hệ miễn dịch chưa hoàn chỉnh ở giai đoạn đầu) có thể chống lại các bệnh truyền nhiễm (Rose & Orlans, 1981). Sự chuyển giao này xảy ra thông qua một thụ thể trên bề mặt của màng túi noãn hoàng, cho phép sự vận chuyển có chọn lọc của tất cả các quần thể IgY có trong máu của gà mẹ (Mohammed & cs., 1998; Morrison & cs., 2002; Tressler & Roth, 1987). Kháng thể IgY là sản phẩm thu được từ lòng đỏ trứng của những con gà đã được gây miễn dịch. Sản phẩm này chứa hàm lượng cao các kháng thể đặc hiệu và các chất hỗ trợ miễn dịch sẵn có trong lòng đỏ trứng. Bên cạnh đó, việc sản xuất IgY từ lòng đỏ trứng để sử dụng cho gà lại mang đến những ưu việt riêng đối với hệ miễn dịch. Năng suất sản xuất kháng thể IgY của 1 con gà 17-35g IgY/gà/năm gấp 5 đến 10 lần so với lượng IgG thu được từ 1 con thỏ/năm (Schade & cs., 2005), ngoài ra chi phí cho việc duy trì một đàn gà đẻ trứng thấp hơn nhiều so với việc duy trì đàn thỏ để có một lượng kháng thể tương đương. Việc sản xuất kháng thể đặc hiệu từ lòng đỏ trứng giúp làm giảm các vi phạm về đạo đức động vật nuôi. Việc sử dụng kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng để phòng và trị bệnh cho vật nuôi là một phương án hiệu quả trong xu hướng chăn nuôi sạch, hạn chế sử dụng thuốc kháng sinh.

Sử dụng vacxin đúng quy trình là một biện pháp hiệu quả để ngăn chặn và kiểm soát bệnh Gumboro trên gà. Bên cạnh đó việc sử dụng kháng thể lòng đỏ trong quá trình điều trị gà sau khi mắc bệnh đã cho thấy hiệu quả chữa bệnh lên đến 90% (số liệu tham khảo điều trị thực tế). Các sản phẩm IgY trên thị trường Việt Nam hiện tại có hai nguồn chủ yếu, các sản phẩm trong nước là các IgY dạng thô, sử dụng toàn bộ lòng đỏ trứng chưa tách chiết, trong quá trình tiêm, thường gây ra các vết sưng viêm cho gà tại vị trí tiêm, ảnh hưởng đến sức khỏe và chất lượng vật nuôi. Các sản phẩm dạng thô có

hàm lượng chất dinh dưỡng lớn dẫn đến nguy cơ nhiễm khuẩn trong sản phẩm rất cao nên các sản phẩm này chủ yếu được bảo quản bằng Formalin và đây là một nguyên nhân làm giảm nhanh hiệu giá của kháng thể đặc hiệu, do đó làm giảm đáng kể thời hạn sử dụng của sản phẩm, chưa kể đến ảnh hưởng của formalin tồn dư trong chất lượng sản phẩm thịt sau này. Sản phẩm nhập khẩu từ Trung Quốc là sản phẩm tinh chế nhưng có giá thành cao, thời gian nhập hàng và vận chuyển kéo dài trong khi thời hạn sử dụng của sản phẩm ngắn gây khó khăn trong quá trình tiếp cận và sử dụng sản phẩm. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tinh chế kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng gà và ứng dụng để phòng và điều trị bệnh Gumboro trên gà. Sản phẩm kháng thể tinh chế được tạo ra kỳ vọng sẽ có giá thành hạ so với sản phẩm ngoại nhập, đồng thời hạn chế những nhược điểm của kháng thể lòng đỏ dạng thô.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Gà mái giống ISA Brown 16 tuần được sử dụng để gây miễn dịch và thu trứng sản xuất kháng thể. Gà con 14 ngày tuổi để thực hiện thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng và trị bệnh của kháng thể lòng đỏ tinh chế.

- Vacxin 3 trong 1 Nobilis IB multi+G+ND

- Virus IBD cường độc: Chủng IBDV cường độc được phân lập từ thực địa do Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Sinh học Thú y cung cấp. Chủng virus này được vô hoạt với 0,2% Formalin sau đó được phối trộn với chất bổ trợ MONTANIDETM IMS 1313 VGN trước khi gây miễn dịch cho gà.

- Kit ELISA: IDEXX IBD Ab Test - Infectious Bursal Disease Virus Antibody Test kit

2.2. Phương pháp

2.2.1. Quy trình gây tối miễn dịch cho gà mái

Tổng số 30 gà hậu bị giống ISA Brown 16 tuần tuổi khỏe mạnh được chia thành 3 nhóm thí nghiệm. Nhóm 1 (10 con gà) được gây miễn dịch 3 lần với vacxin 3 trong 1 Nobilis IB

multi+G+ND, mỗi lần cách nhau 2 tuần. Nhóm 2 (10 con gà) được gây miễn dịch 3 lần với vaccin và 2 lần với chủng virus cường độc IBD đã được vô hoạt phối trộn với chất bổ trợ, các lần gây miễn dịch cách nhau 2 tuần. Nhóm 3 (10 con) là nhóm gà đối chứng không tiêm. Tất cả gà ở 3 nhóm thí nghiệm được lấy máu và trứng trước mỗi lần gây miễn dịch. Hàm lượng kháng thể IBD có trong huyết thanh và trứng của 3 nhóm thí nghiệm được xác định bằng phản ứng ELISA. So sánh hàm lượng kháng thể IBD có trong trứng của 3 nhóm thí nghiệm để lựa chọn quy trình gây miễn dịch cho gà mái.

2.2.2. Xác định hàm lượng kháng thể IBD bằng phản ứng ELISA

Hàm lượng kháng thể IBD có trong huyết thanh và trứng của 3 nhóm thí nghiệm được xác định bằng kit ELISA IBD của hãng IDEXX, thí nghiệm được tiến hành phản ứng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kết quả phản ứng xác định bằng cách tính tỷ lệ giữa giá trị mẫu kiểm tra trên giá trị đối chứng dương (S/P).

Những mẫu huyết thanh có tỷ lệ S/P $\leq 0,2$ (hiệu giá kháng thể ≤ 96) được coi là âm tính, tỷ lệ S/P $> 0,2$ (hiệu giá kháng thể > 396) là dương tính. Giá trị S/P tỷ lệ thuận với hàm lượng kháng thể Gumboro.

$$\text{Hiệu giá kháng thể} = 10^{1,09 (\log_{10} S/P) + 3,36}$$

2.2.3. Tinh chế kháng thể IgY

Trứng được làm sạch và sát trùng vỏ trước khi sử dụng. Quy trình tách chiết được thực hiện trong phòng sạch đảm bảo vô trùng. Lòng đỏ trứng được tách cẩn thận từ lòng trắng trứng. Lòng đỏ sau đó được hòa loãng với nước cất vô trùng theo tỷ lệ lòng đỏ : nước (1:10). Lòng đỏ trứng pha loãng được chỉnh pH ở 5,5 sau đó để qua đêm -20°C. Tiếp theo, hỗn hợp lòng đỏ được rã đông và ly tâm 5.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C. Sau khi ly tâm, dịch nổi được thu lại, Amonium sulfate được bổ sung với nồng độ cuối cùng 29%, 4°C và được ly tâm ở điều kiện 8.000 vòng/phút, trong 20 phút, 4°C. IgY tinh chế thu được khi hòa lại tủa sau khi ly tâm với 1xPBS. Dịch tinh chế IgY được bổ sung chất bảo quản sau đó chia chai và bảo quản ở 4°C.

2.2.4. Đánh giá hiệu quả phòng bệnh và điều trị bệnh Gumboro của kháng thể IgY tinh chế

Sử dụng 30 gà 14 ngày tuổi khỏe mạnh, đồng đều về khối lượng chưa được tiêm phòng vaccin Gumboro vào thí nghiệm. Gà được chia thành 3 nhóm thí nghiệm, mỗi nhóm 10 con gà, nhóm 1 và nhóm 2 không được bổ sung kháng thể IgY tinh chế, nhóm 3 được tiêm kháng thể IgY tinh chế với liều 0,5 mL/con, tiêm nhắc lại lần 2 sau 1 tuần. Sau 7 ngày tiêm kháng thể mũi 2 ở nhóm 3, cả ba nhóm gà được gây nhiễm với virus Gumboro cường độc với liều 10^2 TCID₅₀/con (TCVN, 2011). Sau khi gà thí nghiệm bắt đầu có biểu hiện lâm sàng của bệnh Gumboro như giảm ăn, ủ rũ, lông xù, run rẩy thì tiến hành tiêm kháng thể IgY tinh chế đối với nhóm 2 với liều 1ml/con, tiêm 2 lần mỗi lần cách nhau 48 giờ. Theo dõi các biểu hiện lâm sàng của bệnh Gumboro ở 3 nhóm, đánh giá tỷ lệ gà ốm, chết ở 3 nhóm gà thí nghiệm.

2.2.5. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản đối với kháng thể IgY tinh chế

Kháng thể tinh chế được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau: -20°C, 4°C, 37°C. Hàm lượng kháng thể kháng IBD được xác định ở các khoảng thời gian bảo quản từ sau 2, 4, 6, 8, 10, 12 tuần đến 12 tháng (ở trong nghiên cứu chỉ thể hiện kết quả đến 12 tuần) theo phương pháp ELISA.

2.2.6. Ảnh hưởng của chất bảo quản đối với kháng thể IgY tinh chế

Kháng thể tinh sạch được bổ sung chất bảo quản ở các nồng độ thường được sử dụng phổ biến, cụ thể 2,0% của formalin và 0,1% của sodium benzoate sau đó bảo quản ở 4°C. Hàm lượng kháng thể kháng IBD được xác định ở các khoảng thời gian bảo quản từ sau 2, 4, 6, 8, 10, 12 tuần đến 12 tháng (ở trong nghiên cứu chỉ thể hiện kết quả đến 12 tuần) theo phương pháp ELISA.

2.2.7. Xử lý số liệu

Số liệu thu thập được xử lý phân tích ANOVA 2 yếu tố bằng phần mềm SAS phiên

bản 9.1. So sánh các giá trị trung bình giữa các nghiệm thức ở mức $P < 0,05$ bằng phép kiểm định Duncan's Multiple range test.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đáp ứng miễn dịch của gà trước và sau khi gây miễn dịch bằng vaccin

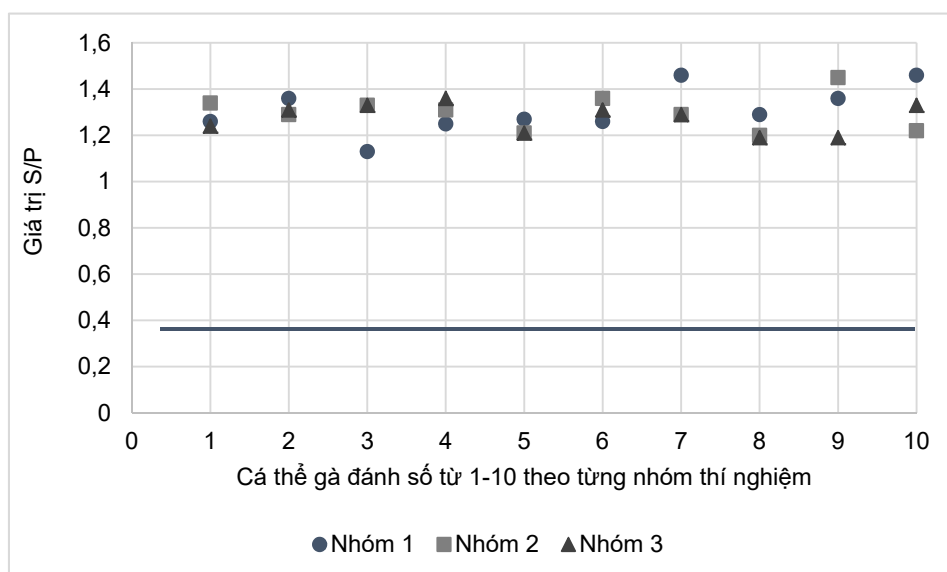
Trước khi nghiên cứu quy trình gây tối miễn dịch cho gà, gà mái giống ISA Brown 16 tuần tuổi được tiến hành xác định hàm lượng kháng thể Gumboro có trong huyết thanh bằng phản ứng ELISA và kết quả được thể hiện trong hình 1.

Hàm lượng kháng thể Gumboro có trong huyết thanh gà trước khi gây miễn dịch đều đạt ngưỡng dương tính (với giá trị S/P trung bình $1,302 \pm 0,08$) không thấy sự khác nhau không có ý nghĩa ở từng cá thể (với $P < 0,05$) khi phân tích bằng phần mềm Excel. Gà mái hậu bị có hàm lượng kháng thể Gumboro trong huyết thanh cao do trong quá trình chăn nuôi, gà hậu bị được tiêm phòng vaccin đầy đủ và theo lịch trình để bảo vệ cho đàn gà trước các tác nhân gây bệnh truyền nhiễm.

Để thu được kháng thể IgY có hiệu giá cao trong lòng đỏ trứng gà thì gà mái cần được gây tối miễn dịch. Trong nghiên cứu này, hai quy trình gây tối miễn dịch cho gà đã được sử dụng và kết quả nghiên cứu biến động hàm lượng

kháng thể Gumboro trong huyết thanh gà sau khi gây tối miễn dịch đã được đánh giá và được thể hiện trong bảng 1.

Kết quả so sánh sự biến động kháng thể của gà mái ở 3 nhóm thí nghiệm (Bảng 1) cho thấy: Nhóm 1 (gà được tiêm vaccin 3 lần mỗi lần cách nhau 2 tuần) hàm lượng kháng thể có sự sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$) mỗi lần tiêm vaccin và hàm lượng kháng thể tăng dần đạt giá trị cao nhất tại tuần thứ 8 (giá trị S/P trung bình $2,04 \pm 0,06$), các tuần tiếp theo hàm lượng kháng thể không tăng thêm. Sự biến động hàm lượng kháng thể trong nhóm 2 cũng có sự sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$) qua các lần tiêm cũng tương tự nhóm 1. Hàm lượng kháng thể tăng dần sau mỗi lần tiêm, tại thời điểm tuần thứ 10 sau khi tiêm mũi 2 với kháng nguyên là virus Gumboro cường độ vô hoạt, hàm lượng kháng thể đạt giá trị cao nhất (giá trị S/P trung bình $2,84 \pm 0,02$). Nhóm 3 đối chứng, sự biến động của hàm lượng kháng thể sai khác nhau không có ý nghĩa ($P < 0,05$) trong thời gian theo dõi thí nghiệm. So sánh hàm lượng kháng thể Gumboro có trong huyết thanh của 3 nhóm thí nghiệm cho thấy ở nhóm 2 cho hàm lượng kháng thể trung bình cao nhất (giá trị S/P trung bình $2,21^A$). Trong thời gian miễn dịch, hàm lượng kháng thể tại thời điểm 8 tuần có hàm lượng kháng thể cao nhất (giá trị S/P trung bình $2,08^A$)



Hình 1. Đồ thị mô tả hiệu giá kháng thể Gumboro của gà mái trước khi gây miễn dịch

Bảng 1. Sự biến động hàm lượng kháng thể Gumboro ở các nhóm thí nghiệm sau khi gây tối miễn dịch

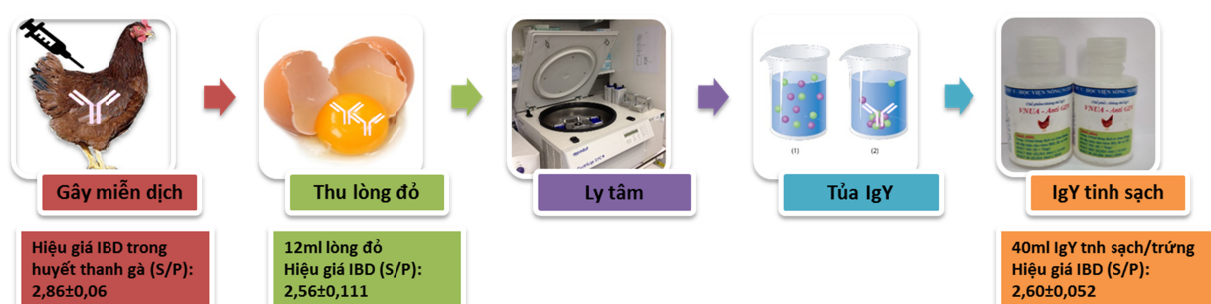
Nhóm	Thời gian miễn dịch (tuần)						Trung bình theo nhóm
	2	4	6	8	10	12	
1	1,29 ^e	1,45 ^d	1,86 ^c	2,04 ^b	1,97 ^b	2,03 ^b	1,77 ^b
2	1,35 ^e	1,48 ^d	1,9 ^c	2,83 ^a	2,84 ^a	2,82 ^a	2,21 ^a
3	1,29 ^e	1,32 ^e	1,36 ^e	1,36 ^e	1,37 ^e	1,34 ^e	1,34 ^c
Trung bình theo thời gian miễn dịch	1,31 ^d	1,43 ^c	1,71 ^b	2,08 ^a	2,07 ^a	2,06 ^a	

Ghi chú: Các ký tự a, b, c... là thứ tự sắp xếp từ cao đến thấp theo nhóm giá trị S/P trung bình. Các giá trị trung bình mang cùng một chữ cái thì không khác biệt có nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

Bảng 2. Hàm lượng kháng thể trong trứng của 3 nhóm thí nghiệm theo thời gian

Nhóm	Thời gian miễn dịch (tuần)					Trung bình theo nhóm
	4	6	8	10	12	
1	1,22 ^e	1,61 ^c	1,86 ^b	1,82 ^b	1,83 ^b	1,67 ^B
2	1,34 ^d	1,66 ^{bc}	2,41 ^a	2,55 ^a	2,53 ^a	2,09 ^A
3	0,98 ^f	1,22 ^e	1,15 ^e	1,08 ^f	1,03 ^f	1,09 ^C
Trung bình theo thời gian miễn dịch	1,21 ^c	1,51 ^b	1,89 ^a	1,91 ^a	1,89 ^a	

Ghi chú: Các giá trị trung bình mang cùng chữ cái theo sau không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).



Hình 2. Quy trình tinh chế IgY từ lòng đỏ trứng

Để đánh giá được sự biến động hàm lượng kháng thể trong trứng ở các nhóm thí nghiệm khác nhau, trứng gà đã được thu theo từng nhóm thí nghiệm vào các thời điểm 4, 6, 8, 10 và 12 tuần sau khi gây tối miễn dịch và kết quả đánh giá phân tích hàm lượng kháng thể bằng phần mềm SAS được thể hiện trong bảng 2. Kết quả nghiên cứu cho thấy sự biến động hàm lượng kháng thể Gumboro trong trứng sai khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) ở 3 nhóm thí nghiệm và theo thời gian miễn dịch. Cụ thể, theo nhóm thí nghiệm, nhóm 2 cho hàm lượng

kháng thể trong trứng cao nhất với giá trị S/P trung bình theo nhóm = 2,09 (xếp nhóm A), tiếp đến là nhóm 1 với giá trị S/P trung bình theo nhóm = 1,67 (xếp nhóm B), nhóm 3 đối chứng có hàm lượng kháng thể thấp nhất với giá trị S/P trung bình theo nhóm = 1,09 (xếp nhóm C). Đánh giá theo thời gian miễn dịch, hàm lượng kháng thể trong trứng đạt giá trị cao nhất tại thời điểm 10 tuần sau khi gây tối miễn dịch cho gà mái với giá trị S/P trung bình theo nhóm = 1,91 (xếp nhóm A) các tuần tiếp theo hàm lượng kháng thể không có sự biến động.

Như vậy, với kết quả sự biến động của hàm lượng kháng thể trong huyết thanh và trong trứng ở 3 nhóm thí nghiệm, có thể thấy rằng quy trình gây tối miễn dịch ở nhóm 2 cho hàm lượng kháng thể trong huyết thanh và trứng cao nhất so với 2 nhóm còn lại. Thời gian hàm lượng kháng thể đạt giá trị cao nhất tại tuần 8 sau gây miễn dịch. Do đó, trong quá trình gây miễn dịch cho đàn gà cần xác định tuổi của gà mái trước gây miễn dịch sao cho thời gian đẻ trứng đều trùng với thời gian mà hàm lượng kháng thể trong trứng đạt giá trị cao nhất.

3.2. Tinh chế và bảo quản kháng thể IgY

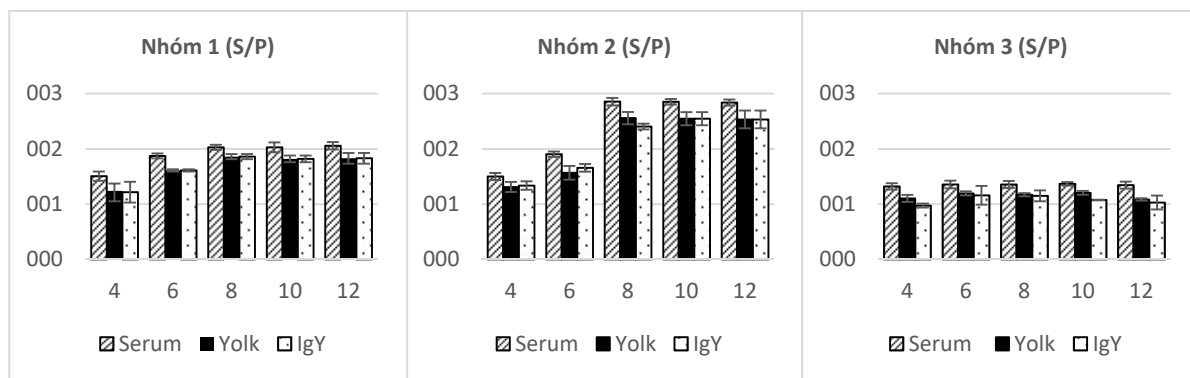
Kết quả tách chiết IgY cho thấy từ một lòng đỏ có thể tích trung bình khoảng 12 mL, với hiệu giá IBD (S/P) $2,56 \pm 0,111$, sau quá trình tách chiết thu được 40 mL dịch IgY tinh chế có hiệu giá IBD tương ứng (S/P) $2,60 \pm 0,052$. Dung dịch kháng thể IgY sau khi tinh chế có màu trắng trong. Lòng đỏ trứng ở dạng đặc quánh chứa hàm lượng lớn các protein, cholesterol, choline, nếu chưa được pha loãng ở độ pha loãng phù hợp, kháng thể IgY chưa được giải phóng hoàn toàn, do đó sau khi tinh sạch, chế phẩm tinh sạch cũng giúp cơ thể vật nuôi dễ dàng hấp thụ hơn. So sánh hàm lượng kháng thể trong huyết thanh gà, trứng và chế phẩm IgY được tách chiết tương ứng (Hình 3) cho thấy lượng kháng thể IgY trong trứng và trong chế phẩm tỷ lệ với hàm lượng kháng thể có trong huyết thanh gà, điều này phù hợp với nghiên cứu của Klemperer (1893). Như vậy, trong quá trình khai thác trứng để sản xuất IgY, cần phải theo dõi định kỳ hàm lượng kháng thể trong huyết thanh gà để có kế hoạch bổ sung miễn dịch hợp lý cho đàn gà.

Nhiệt độ trong quá trình bảo quản luôn ảnh hưởng tới hiệu giá kháng thể Gumboro cũng như chất lượng sản phẩm kháng thể IgY. Để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ tới hiệu giá kháng thể Gumboro trong sản phẩm, hiệu giá kháng thể của sản phẩm IgY tinh chế được theo dõi qua thời gian ở các điều kiện bảo quản khác nhau (-20°C , 4°C và 37°C). Kết quả thu được (Hình 4) cho thấy hàm lượng kháng thể Gumboro trong sản phẩm IgY tinh chế được bảo quản trong điều kiện 37°C giảm nhanh sau 2 tuần (giá trị S/P sau 2 tuần bảo quản = $0,70 \pm 0,18$). Trong khi đó, sản phẩm được bảo quản trong điều kiện -20°C và 4°C hàm

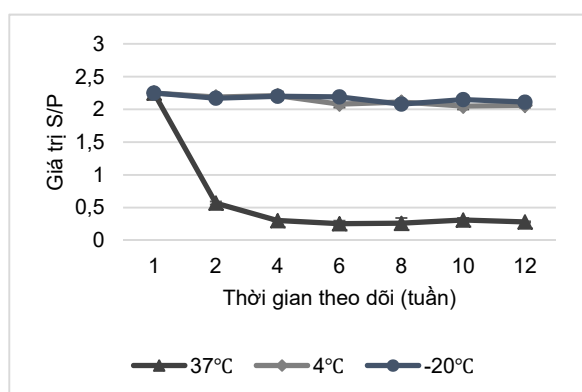
lượng kháng thể Gumboro ổn định trong thời gian theo dõi. Hàm lượng kháng thể Gumboro bảo quản ở điều kiện 4°C thấp hơn so với khi bảo quản ở điều kiện -20°C , tuy nhiên, sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Do đó, kết luận bảo quản kháng thể IgY tinh chế ở điều kiện 4°C là phù hợp với các kết quả được công bố (Schade & cs., 2005). Tương tự như nhiệt độ bảo quản, chất bảo quản sử dụng trong sản phẩm kháng thể cũng ảnh hưởng tới hiệu giá kháng thể Gumboro cũng như chất lượng sản phẩm. Formalin và Sodium benzoate là 2 chất bảo quản phổ biến có tác dụng kháng khuẩn được lựa chọn sử dụng trong nghiên cứu. Sản phẩm được bổ sung chất bảo quản, sau đó theo dõi hiệu giá kháng thể Gumboro theo thời gian bảo quản ở 4°C . Kết quả nghiên cứu cho thấy kháng thể IgY được bảo quản bằng Formalin có hàm lượng kháng thể Gumboro giảm dần theo thời gian, sau 12 tuần bảo quản giá trị S/P còn $0,24 \pm 0,03$. Trong khi đó, kháng thể IgY tinh chế được bảo quản bằng Sodium benzoate thì hàm lượng kháng thể ổn định trong thời gian theo dõi (Hình 5). Formalin là chất bảo quản có khuyến cáo gây ảnh hưởng đến sức khỏe sinh vật khi phơi nhiễm ở nồng độ cao, trong khi đó Sodium benzoate là chất bảo quản được sử dụng trong thực phẩm, do đó Sodium benzoate cần được nghiên cứu thêm để có thể sử dụng trong quá trình sản xuất lâu dài.

3.3. Đánh giá hiệu quả phòng và điều trị bệnh Gumboro của kháng thể IgY tinh chế

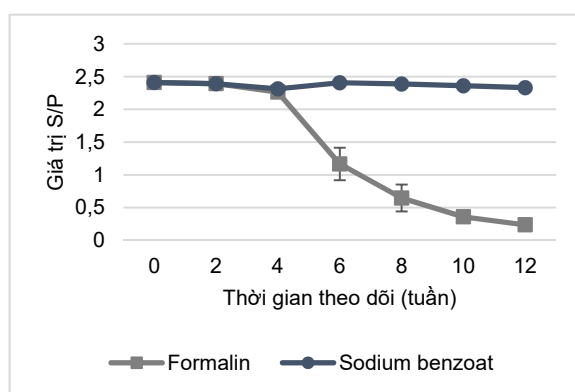
Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng kháng thể Gumboro của các nhóm gà trước khi tiêm kháng thể đều ở ngưỡng âm tính (giá trị S/P $< 0,2$). Tại nhóm 3, gà được tiêm kháng thể IgY tinh chế với liều 0,5 mL/con, nhắc lại sau 1, hàm lượng kháng thể trong huyết thanh tăng lên đạt ngưỡng dương tính (giá trị S/P = $1,31 \pm 0,02$), trong khi đó, ở nhóm 1 và 2 hàm lượng kháng thể vẫn ở ngưỡng âm tính (Bảng 3). Bảy ngày sau tiêm kháng thể mũi 2 ở nhóm 3, cả 3 nhóm gà được nhỏ mắt bằng virus Gumboro độc lực cao phân lập từ thực địa với liều 10^2 TCID₅₀/con. Sau 2 ngày gây nhiễm virus độc lực cao, gà nhóm 2 được tiêm kháng thể IgY tinh chế với liều 1 mL/con lặp lại mũi 2 sau 48 h, theo dõi biểu hiện triệu chứng, bệnh tích và tỷ lệ chết ở các nhóm thí nghiệm (Bảng 4).



Hình 3. Mối tương quan hàm lượng kháng thể Gumboro trong huyết thanh gà, lòng đỏ trứng và chế phẩm IgY sau tinh chế tương ứng của các nhóm gà



Hình 4. Đồ thị mô tả hiệu giá kháng thể của sản phẩm được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau theo thời gian



Hình 5. Đồ thị mô tả hiệu giá kháng thể của sản phẩm được bổ sung chất bảo quản khác nhau theo thời gian

Bảng 3. Giá trị S/P của các nhóm gà trước và sau khi tiêm kháng thể

	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3
Trước tiêm kháng thể	0,11 ± 0,04	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,02
Sau tiêm kháng thể cho nhóm 3	0,12 ± 0,03	0,09 ± 0,05	1,31 ± 0,02

Theo kết quả công virus Gumboro cường độc (Bảng 4) ở nhóm 1 và 2 không được tiêm kháng thể IgY, tỷ lệ gà ốm cao hơn, lần lượt là 7/10 và 6/10, trong đó có các triệu chứng ỉa chảy, phân loãng nhiều nước, vàng trắng lẫn lộn, sánh nhót, có bọt lớn nhờn là 6/10 con. Nhóm 3 được tiêm kháng thể, tỷ lệ gà ốm là 2/10, trong đó xuất hiện các triệu chứng ỉa chảy, phân loãng nhiều nước, vàng trắng lẫn lộn, sánh nhót, có bọt lớn nhờn là 1/10 con. Trong những ngày tiếp theo, ở nhóm 1 tỷ lệ gà ốm tăng lên 9/10 con, tỷ lệ gà chết 9/10

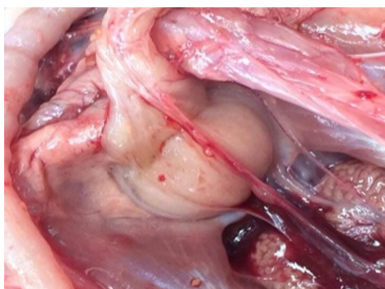
con với bệnh tích điển hình của bệnh Gumboro như xuất huyết cơ đùi, túi Fabricius phía ngoài thấm dịch keo nhầy gelatin trong suốt, mặt mũi khế xuất huyết, mụn nát, màu kem đục (Cheville, 1967; Helmboldt & Garner, 1964) (Hình 6). Sau 2 ngày công virus độc lực cao, nhóm 2 được tiêm kháng thể IgY tinh chế, trong các ngày tiếp theo tỷ lệ gà ốm giảm còn 4/10 con, tỷ lệ chết 1/10 con với các bệnh tích điển hình của bệnh Gumboro. Ở nhóm 3 có 1/10 con xuất hiện các triệu chứng nhưng không có con nào chết

trong quá trình thí nghiệm. Như vậy kết quả phòng bệnh của nhóm 3 cho thấy, tiêm kháng thể trước khi công virus độc lực cao có khả năng bảo hộ gà trước tác nhân gây bệnh Gumboro đồng

thời đánh giá phát triển bệnh Gumboro ở nhóm 2 cho thấy kháng thể IgY có khả năng điều trị bệnh Gumboro, giúp gà nhiễm virus sống sót và giảm số lượng gà phát bệnh.

Bảng 4. Kết quả công virus độc lực cao trên các nhóm gà thí nghiệm

Chỉ tiêu theo dõi	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3
Số gà thí nghiệm	10	10	10
Lượng kháng thể/con	-	-	0,5 mL/con
Liều công cường độc	10 ² TCID ₅₀ /con		
* Triệu chứng lâm sàng (sau 2 ngày công)			
- Gà bỏ ăn, ủ rũ, nằm bệt không vận động	7/10	6/10	2/10
- Ỉa chảy, phân loãng, nhiều nước vàng trắng lẫn lộn, sánh nhớt, có bọt, lẫn nhớt	6/10	6/10	1/10
* Điều trị			
Lượng kháng thể/con	-	1 mL/con	-
* Triệu chứng lâm sàng			
- Gà bỏ ăn, ủ rũ, nằm bệt không vận động	9/10	4/10	1/10
- Ỉa chảy, phân loãng, nhiều nước vàng trắng lẫn lộn, sánh nhớt, có bọt, lẫn nhớt	9/10	3/10	0/10
* Bệnh tích			
- Xuất huyết cơ ngực và cơ đùi.	9/10	1/10	0/10
- Túi Fabricius phía ngoài thẩm dịch keo nhầy gelatin, trong suốt, mặt mũi khế xuất huyết, mủn nát, màu kem đục	9/10	1/10	0/10
* Tỷ lệ chết	9/10	1/10	0/10



Hình 6. Triệu chứng và bệnh tích của gà thí nghiệm

4. THẢO LUẬN

Việc sử dụng IgY tinh sạch từ lòng đỏ trứng gà còn mở ra nhiều cơ hội ứng dụng trong việc điều trị các bệnh khác nhau do khả năng vận chuyển kháng thể đặc hiệu từ huyết thanh gà vào lòng đỏ trứng (Mohammed & cs., 1998; Rose & Orlans, 1981; Tressler & Roth, 1987). Theo Lanzarini & cs. (2018) tỷ lệ của kháng thể IgY đặc hiệu chiếm từ 2-10% trong tổng số kháng thể IgY, như vậy có khả năng thu được kháng thể đặc hiệu mong muốn với năng suất cao từ lòng đỏ trứng bằng cách gây miễn dịch cho gà với kháng nguyên phù hợp. Lượng kháng thể IgY đặc hiệu trong trứng không phụ thuộc vào kích thước của trứng mà tỷ lệ thuận với hàm lượng kháng thể trong huyết thanh (Loeken & Roth, 1983), vì vậy để thu được hiệu quả miễn dịch cao nhất cần có quy trình gây miễn dịch tối ưu, điều này phụ thuộc vào giống gà mái sử dụng gây miễn dịch, thời gian gây miễn dịch, kháng nguyên và liều lượng kháng nguyên gây miễn dịch.

Trong nghiên cứu này gà mái giống ISA Brown 16 tuần tuổi đã được lựa chọn và thích hợp cho quá trình gây tối miễn dịch để đảm bảo gà có miễn dịch cao khi bước vào thời kỳ thu hoạch trứng và năng suất thu hoạch trứng được đảm bảo. Hiệu giá kháng thể trong chế phẩm tỷ lệ với hàm lượng kháng thể trong huyết thanh, điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây (Abd El-Ghany, 2011; Klemperer, 1893). Thời gian hàm lượng kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh đạt giá trị cao nhất tại tuần 8 sau khi gây tối miễn dịch, tuy nhiên hàm lượng kháng thể đặc hiệu trong trứng đạt giá trị cao nhất vào tuần thứ 10 sau khi gây tối miễn dịch, điều này có thể do quá trình chuyển kháng thể đặc hiệu từ huyết thanh sang trứng cần thời gian, kết quả nghiên cứu này phù hợp với những công bố trước đây bởi Patterson & cs. (1962) và Wooley & Landon (1995). Việc tinh sạch IgY cũng giúp kéo dài quá trình bảo quản sản phẩm IgY do loại bỏ được lượng lớn các hợp chất hữu cơ trong lòng đỏ trứng.

Trong nghiên cứu, việc sử dụng chất bảo quản Sodium benzoate thay thế cho Formalin

đảm bảo duy trì hiệu giá của kháng thể đặc hiệu, cũng như sự an toàn cho động vật sử dụng thuốc. Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu quả rõ rệt trong việc phòng và điều trị bệnh cho gà của IgY cùng việc sử dụng IgY cho phòng bệnh và giúp gà phục hồi sau khi bị nhiễm virus, hiệu quả điều trị trên quy mô lớn hơn của IgY tinh chế cũng đã được chứng minh trước đây (Malik & cs., 2006; Mohamed & cs., 2016). Bên cạnh đó, thí nghiệm gây bệnh thực nghiệm cũng chứng minh sự an toàn của chế phẩm, không có các đáp ứng phản vệ do kháng thể có nguồn gốc cùng loài với động vật được sử dụng. Tuy nhiên đây mới chỉ là những nghiên cứu bước đầu, cần phải tiến hành thêm các thí nghiệm để tối ưu quy trình sản xuất trên quy mô công nghiệp cũng như quy trình sử dụng tối ưu của chế phẩm.

5. KẾT LUẬN

Quy trình gây miễn dịch cho gà mái giống ISA Brown 16 tuần tuổi bằng vaccin Nobilis IB multi+G+ND kết hợp với virus Gumboro cường độc vô hoạt cho đáp ứng miễn dịch cao nhất, đảm bảo trứng gà có hiệu giá kháng thể cao phục vụ việc sản xuất kháng thể IgY tinh chế dùng để phòng và trị bệnh Gumboro trên gà. Kháng thể IgY tinh chế có hiệu giá cao (ELISA có giá trị S/P >1,5) có khả năng phòng và điều trị bệnh Gumboro trên gà.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí đề tài “Research and Production of Antibody (IgY) Product for Prevention and Treatment of Gumboro, Newcastle and Infectious Bronchitis (IB) Disease in Chickens” do dự án Việt Bỉ tài trợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abd El-Ghany W. (2011). Comparison between immunoglobulins IgY and the vaccine for prevention of infectious bursal disease in chickens. *Global Veterinaria*. 6:16-24.
- Cheville N.F. (1967). Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen,

- and thymus of the chicken. The American journal of pathology. 51: 527.
- Helmboldt C.F. & Garner E. (1964). Experimentally induced Gumboro disease (IBA). Avian Diseases. 8: 561-575.
- Klemperer F. (1893). Ueber natürliche Immunität und ihre Verwertung für die Immunisierungstherapie. Arch Exp Pathol Pharmacol. 31: 356-382.
- Lanzarini N.M., Bentes G.A., Volotão E.d.M. & Pinto M.A. (2018). Use of chicken immunoglobulin Y in general virology. Journal of Immunoassay and Immunochemistry. 39: 235-248. DOI: 10.1080/15321819.2018.1500375.
- Loeken M.R. & Roth T.F. (1983). Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. Immunology. 49: 21-8.
- Malik M.W., Ayub N. & Qureshi I.Z. (2006). Passive immunization using purified IgYs against infectious bursal disease of chickens in Pakistan. Journal of veterinary science. 7: 43-46. DOI: 10.4142/jvs.2006.7.1.43.
- Mohamed M., Maary K., Dawoud T., Mubarak A., Hessain A. & Mohamed K. (2016). Production and Evaluation of the Immuno-protective Efficacy of the Immunoglobulins IgY-antibodies Prepared Against Infectious Bursal Disease. International Journal of Pharmacology. 12: 749-753. DOI: 10.3923/ijp.2016.749.753.
- Mohammed S.M., Morrison S., Wims L., Trinh K.R., Wildeman A.G., Bonselaar J. & Etches R.J. (1998). Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. Immunotechnology. 4: 115-25.
- Morrison S.L., Mohammed M.S., Wims L.A., Trinh R. & Etches R. (2002). Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. Mol Immunol. 38: 619-25. DOI: 10.1016/S0161-5890(01)00095-5.
- Patterson R., Youngner J.S., Weigle W.O. & Dixon F.J. (1962). Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. J Immunol. 89: 272-8.
- Rose M.E. & Orlans E. (1981). Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. Dev Comp Immunol. 5: 15-20. DOI: 10.1016/S0145-305X(81)80003-1.
- Schade R., Calzado E.G., Sarmiento R., Chacana P.A., Porankiewicz-Asplund J. & Terzolo H.R. (2005). Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. Alternatives to Laboratory Animals. 33: 129-154.
- TCVN (2011). TCVN 8669-6:2011 Quy trình kiểm nghiệm vacxin - Phần 6: Vacxin gumboro nhược độc.
- Tressler R.L. & Roth T.F. (1987). IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. J Biol Chem. 262: 15406-12.
- Woolley J.A. & Landon J. (1995). Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. Journal of Immunological Methods. 178: 253-265. DOI: 10.1016/0022-1759(94)00263-V