

HIỆU LỰC MỘT SỐ LOẠI VACCIN CÚM GIA CẦM SỬ DỤNG TRÊN GÀ CHỐNG LẠI VIRUS CÚM A/H5N6 CLADE 2.3.4.4B

Nguyễn Văn Lâm², Tô Long Thành¹, Nguyễn Hoàng Đăng¹, Nguyễn Đăng Thọ¹

TÓM TẮT

Để đánh giá hiệu lực của một số loại vaccin chống lại virus gây bệnh cúm gia cầm A/H5N6 cường độc mới xuất hiện tại Việt Nam, thí nghiệm đã được tiến hành trên gà với vaccin Navet-Viflucac sản xuất trong nước, vaccin Re-5 và vaccin Re-6 nhập từ Trung Quốc. Kết quả xét nghiệm huyết thanh gà sau tiêm phòng bằng phương pháp HI, dùng kháng nguyên đồng chủng với kháng nguyên trong vaccin cho thấy: vaccin Navet-Viflucac kích thích gà tạo kháng thể với hiệu giá $4,3\log_2$; với vaccin Re-5, hiệu giá kháng thể là $7,8\log_2$ và với vaccin Re-6, hiệu giá kháng thể là $5,3\log_2$. Sau khi công cường độc bằng virus A/H5N6 clade 2.3.4.4B, đã thu được kết quả như sau: vaccin Navet-Viflucac, Re-5 và Re-6 đều có khả năng bảo hộ 70% đối với gà được tiêm phòng. Gà của tất cả 3 nhóm tiêm vaccin đều bài thải virus trong 10 ngày sau khi công cường độc, tuy nhiên nhóm gà được tiêm vaccin Navet-Viflucac giảm bài thải virus một cách đáng kể 10 ngày sau khi công cường độc. Nhóm gà tiêm vaccin Re-5 vẫn bài thải nhiều virus sau 10 ngày công cường độc.

Từ khóa: virus cúm gia cầm A/H5N6, vaccin Navet-Viflucac, Re-5 và Re-6, hiệu lực, gà, công cường độc

Efficacy of Avian influenza vaccines testing in chicken against A/H5N6 clade 2.3.4.4B virus

Nguyen Van Lam, To Long Thanh, Nguyen Hoang Dang, Nguyen Dang Tho

SUMMARY

In order to assess the efficacy of some vaccines against the newly- occurred avian influenza A/H5N6 virus in Viet Nam, this study was conducted on the chickens with locally-made Navet-Viflucac vaccine, the Re-5 vaccine and the Re-6 vaccine imported from China. The result of testing chicken serum after vaccination using HI test with the antigen homologous with that in vaccines showed that these vaccines induced the experimental chickens in antibody production with a titre of $4.3\log_2$ for Navet viflucac vaccine; $7.8\log_2$ for Re-5 vaccine and $5.3\log_2$ for Re-6 vaccine. The result of virulent challenge with A/H5N6 clade 2.3.4.4B showed that the protective rate of the vaccinated chickens for all three vaccines Navet-Viflucac, Re-5 and Re-6 vaccines was 70%. The vaccinated chickens with three vaccines discharged virus within 10 days after challenge, but the vaccinated chickens with Navet-Viflucac significantly reduced viral shedding in 10 days, post-challenge. The vaccinated chickens with Re-5 vaccine excreted virus with high level in 10 days, post-challenge.

Keywords: Avian influenza A/H5N6 virus, Navet-Viflucac, Re-5 and Re-6 vaccines, vaccine efficacy, chicken, virulent challenge test.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh cúm gia cầm (CGC) xảy ra lần đầu tiên tại Việt Nam vào cuối năm 2003 đầu năm 2004, được ghi nhận là do virus cúm A/H5N1 thể độc

lực cao (HPAI) gây nên [2]. Từ đó đến nay, dịch CGC H5N1 vẫn xảy ra tại Việt Nam, tuy nhiên quy mô dịch đã thay đổi, trở nên nhỏ lẻ và phân tán [3]. Bên cạnh đó, cũng từ năm 2014, tại Việt Nam đã xuất hiện virus cúm type A H5N6, gây

¹. Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương

². Khoa Kỹ thuật nông nghiệp, Trường Cao đẳng Kinh tế - Kỹ thuật Vĩnh Phúc

nên các ổ dịch ở nhiều tỉnh miền Bắc và miền Trung. Virus có nguồn gốc gen HA thuộc về clade 2.3.4.4 là nhánh tiến hóa của clade 2.3.4 đã lưu hành trong các năm 2008-2012 [5].

Vaccin CGC được sử dụng tại Việt Nam từ năm 2005, góp phần làm giảm số lượng ổ dịch, giảm số lượng gia cầm mắc bệnh và giảm thiệt hại kinh tế do dịch CGC gây ra, cũng như giảm số lượng người bị nhiễm và tử vong do virus CGC [2],[3]. Tuy nhiên, do virus CGC liên tục biến đổi, nên các vaccin cũng phải được thay đổi để có thể có hiệu lực cao nhất đối với chủng virus đang lưu hành [3]. Đánh giá hiệu lực của vaccin, đặc biệt là các loại dùng trong chương trình tiêm phòng CGC được Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương thường xuyên thực hiện và đó là căn cứ để Cục Thú y chỉ đạo phòng, chống dịch CGC kịp thời.

Các chủng virus cúm H5N6 tại Việt Nam có liên hệ mật thiết với các virus H5N1, H5N2, H5N8 từng lưu hành ở châu Á, thể hiện ở trình tự gen HA đều có chung nguồn gốc [5]. Các virus H5N6 này đã được phân lập và giải trình tự đều thuộc về clade 2.3.4.4, là một nhánh phụ của clade 2.3.4 từng lưu hành rộng ở Đông Á và Đông Nam Á trong giai đoạn 2007 - 2010. Trong đó, clade 2.3.4.4 lại được chia thành 2 nhóm nhỏ hơn ký hiệu là 2.3.4.4A (China-like) và 2.3.4.4B (Lao-like) [3, 5].

Trong khuôn khổ đề tài “*Nghiên cứu sự phân bố các biến chủng (clade) mới của virus cúm A/H5N1 trên đàn gia cầm ở Việt Nam làm cơ sở cho việc phòng chống dịch bệnh đạt hiệu quả cao*”, có mã số ĐTĐL.CN-10/15 do Bộ Khoa học và Công nghệ cấp kinh phí; hiệu lực của một số loại vaccin với biến thể virus mới xuất hiện A/H5N6 clade 2.3.4.4B được trình bày trong bài viết này.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung

- Đánh giá đáp ứng miễn dịch ở gà sau khi tiêm phòng vaccin CGC.
- Đánh giá khả năng bảo hộ bệnh lâm sàng của vaccin bằng thử thách gà với virus cúm A/H5N6 cường độc.
- Định lượng virus bài thải từ gà được tiêm phòng, sau đó được công cường độc (CCĐ).

2.2. Các nguyên liệu chính

- Virus CGC A/H5N6 (*A/Mdk/Vietnam(NgheAn)/NCVD15A52/2015(H5N6)*) thuộc clade 2.3.4.4B đại diện cho virus lưu hành tại Việt Nam năm 2015, được phân lập từ gà bệnh tại Nghệ An. Phả hệ của chủng virus dùng trong thí nghiệm này được thể hiện trên hình 1.
- Vaccin Navet-Vifluvac (clade 1) sản xuất trong nước, vaccin Re-5 (clade 2.3.4) và vaccin Re-6 (clade 2.3.2.1A) nhập từ Trung Quốc.
- Gà 1 ngày tuổi (Lương Phượng lai) từ đàn khỏe mạnh, không có kháng thể (KT) kháng virus cúm H5, không mang trùng virus cúm type A, nhận từ Trung tâm nghiên cứu gia cầm Thụy Phương – Viện Chăn nuôi.
- Kit chiết tách RNA, kit nhân gen Real-time RT-PCR
- Môi và mẫu dò đặc hiệu phát hiện gen N6
- Kháng nguyên (KN) cúm thuộc clade 1, clade 2.3.2.1 và clade 2.3.4.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

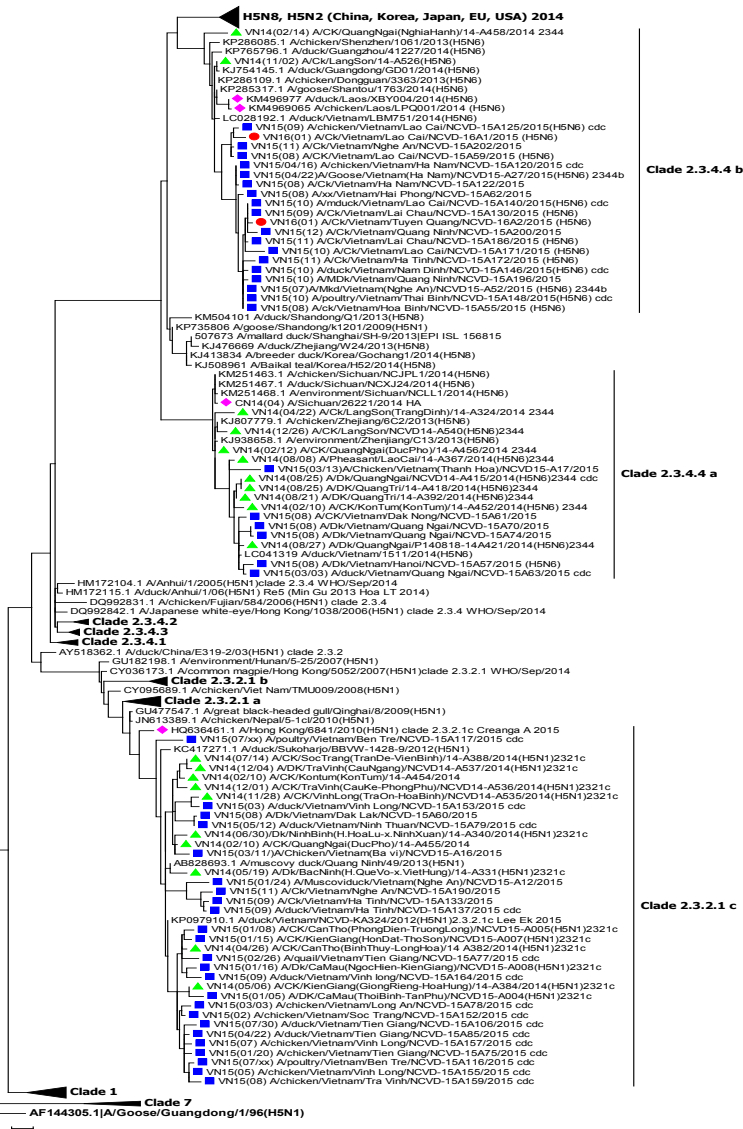
Thí nghiệm được thiết kế dựa trên các hướng dẫn về đánh giá hiệu lực vaccin cúm gia cầm của FAO và OIE [6, 7].

2.3.1. Thiết kế thí nghiệm

Sử dụng 165 gà 3 tuần tuổi, được chia thành 4 lô: 3 lô được tiêm vaccin và 1 lô đối chứng không được tiêm vaccin. Bố trí thí nghiệm được thể hiện trên bảng 1.

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm kiểm tra hiệu lực vaccin

Nhóm gà	Số lượng (con)	Liều tiêm (ml)	Ghi chú
Navet-Viflucav	45	0,5ml/gà	
Re-5	45	0,3ml/gà	Nuôi cách ly đàn gà đối chứng
Re-6	45	0,3ml/gà	
Đối chứng	30	Không tiêm	

**Hình 1. Phả hệ của virus và các chủng vaccin dùng trong thí nghiệm**

Nhóm 1 gồm 45 con được tiêm vaccin Navet-Viflucav, nhóm 2 gồm 45 con được tiêm vaccin Re-5, nhóm 3 gồm 45 con được tiêm vaccin Re-6 và nhóm đối chứng 30 con không

được tiêm vaccin. Trước khi tiêm, lấy máu tất cả gà kiểm tra KT kháng KN H5 bằng phương pháp HI, chỉ những gà âm tính KT mới được dùng trong thí nghiệm.

Gà được tiêm 1 mũi vaccin lúc 3 tuần tuổi với liều tiêm, đường tiêm theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Cụ thể:

- Vaccin Navet-Vifluvac: Dưới da cổ tại vị trí 1/3 phía dưới, 0,5 ml/con.

- Vaccin Re-5 và Re-6: Dưới da cổ tại vị trí 1/3 phía dưới, 0,3 ml/con.

- Ba tuần sau khi tiêm vaccin, lấy máu xét nghiệm KT kháng KN H5 bằng phương pháp HI sử dụng KN đồng chủng với KN trong vaccin.

- Dùng 10/45 gà được tiêm vaccin và 10/30 gà đối chứng trong thí nghiệm công cường độc.

- Công cường độc cho gà bằng cách nhỏ mũi 100 µl hỗn dịch virus có hiệu giá là $10^6 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ được nuôi cấy trên tế bào sơ phôi gà.

- Gà của lô đối chứng được nuôi cùng với gà của các lô khác.

- Theo dõi gà trong vòng 10 ngày sau khi gây nhiễm, chấm điểm lâm sàng hàng ngày theo tiêu chí đánh giá của OIE về thử nghiệm virus CGC [7].

- Vào ngày thứ 3, thứ 10 sau khi công cường độc, hoặc khi gà chết, lấy mẫu swab hầu họng để xác định lượng virus bài thải. Giá trị $\text{Ct} > 35$ được coi là âm tính.

- Những gà chết hoặc sống sót sau 10 ngày theo dõi được mổ khám để đánh giá bệnh tích đại thể.

2.3.2. Phương pháp xét nghiệm

- Phương pháp HI đánh giá hàm lượng KT (TCVN 8400-26:2014)[1]: Sử dụng KN đồng chủng với chủng virus sản xuất vaccin, các loại kháng nguyên dùng cho xét nghiệm được thể hiện trong bảng 2. Sử dụng cả 3 loại KN kể trên để xét nghiệm huyết thanh gà đối chứng.

Bảng 2. Các loại kháng nguyên dùng trong xét nghiệm huyết thanh cho gà thí nghiệm

Kháng nguyên	Tên virus	Nhóm gà xét nghiệm huyết thanh
H5N1 thuộc HA clade 1	<i>A/Vietnam/1203/04 (H5N1)-PR8/CDC-RG</i>	Navet-Vifluvac
H5N1 thuộc HA clade 2.3.4	<i>A/Anhui/01/2005 (H5N1)-PR8-IBCD-CDC-RG6</i>	Re-5
Chủng virus vaccin H5N1 thuộc HA clade 2.3.2.1 A	<i>A/Hubei/1/2010(H5N1)-PR8-IDC-CDC-RG30</i>	Re-6

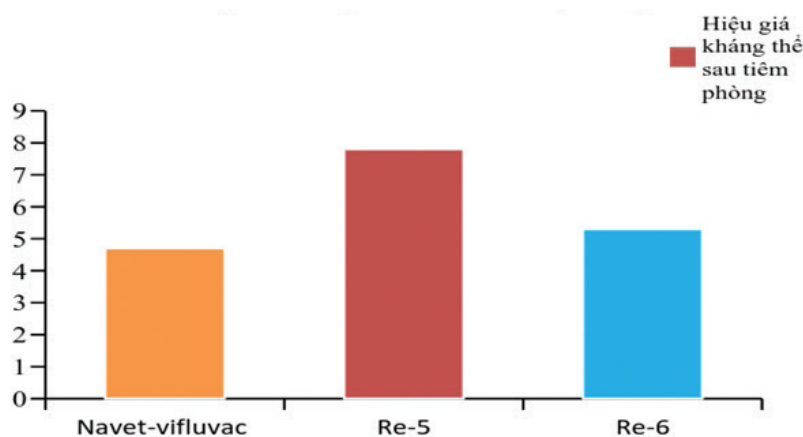
- Phương pháp Real-time RT-PCR xác định lượng virus bài thải sau khi CCD (TCVN 8400-26:2014)[1]: Tách chiết ARN từ bệnh phẩm bằng kit Qiagen RNeasy mini kit (Cat# 74106); phát hiện và định lượng ARN (gen N6) bằng kit Invitrogen SuperScript III Platinum One-step qRT-PCR system (Ref#11732-020) với bộ primers/probe đặc hiệu (Forward primer 5'-CCC CAC CAA TGG GAA CTG-3'; Reverse primer 5'-TCT AGG AAT GCA AAC CCT TTT ACC-3'; Probe 5'-FAM-CCA ATA ACA GGA GGG AGC CCA GAC CC-BHQ1-3'). Chu trình của phản ứng RT-PCR: 50°C- 15 phút, 95°C- 2 phút; 95°C-10 giây + 60°C-30 giây, lặp lại 40 chu kỳ.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Định lượng kháng thể kháng virus cúm A/H5N1 của gà sau tiêm phòng

Ba tuần sau khi tiêm vaccin, lấy máu tất cả gà để định lượng KT kháng virus cúm H5N1 bằng phương pháp HI. Kết quả HI được minh họa trên hình 2.

Kết quả thu được: Gà được tiêm vaccin Navet-Vifluvac có hiệu giá kháng thể (HGKT) trung bình thấp nhất ($4,7 \log_2$), gà được tiêm vaccin Re-5 có HGKT trung bình cao nhất ($7,8 \log_2$) và gà được tiêm vaccin Re-6 có HGKT trung bình là $5,3 \log_2$. So sánh với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Hoàng Đăng và cs. [4] thấy



Hình 2. Hiệu giá kháng thể trung bình của các lô gà được tiêm vaccin

HGKT đạt được ở gà sau khi sử dụng vaccin Navet-Vifluvac và Re-5 có giá trị tương đương, lần lượt là $5,2\log_2$ và $7,4\log_2$. Có thể nhận thấy vaccin nhập ngoại kích thích đáp ứng miễn dịch đặc hiệu cao hơn so với vaccin sản xuất trong nước với cùng liệu trình. Tuy nhiên, HGKT chỉ nói lên khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch của vaccin đối với con vật được tiêm. Vaccin có tác dụng bảo hộ lâm sàng chống lại virus cường độc hay không, phụ thuộc vào mức độ tương đồng giữa kháng nguyên vaccin với virus cường độc đánh giá qua thử thách cường độc.

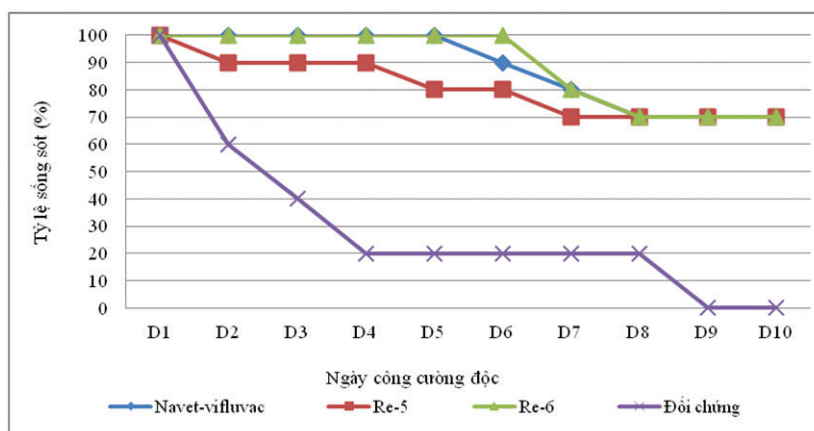
3.2. Thử thách cường độc với virus A/H5N6 clade 2.3.4.4B

Ba tuần sau khi tiêm vaccin, gây nhiễm cho

các nhóm gà bằng virus A/H5N6 clade 2.3.4.4B. Theo dõi lâm sàng trong vòng 10 ngày sau khi gây nhiễm, lấy mẫu swab họng vào ngày thứ 3 và thứ 10 hoặc khi gà chết để định lượng virus bài thải.

Kết quả theo dõi lâm sàng như sau:

- Gà nhóm đối chứng bắt đầu chết vào ngày thứ 2 và chết 100% vào ngày thứ 9 sau khi CCD. Diễn biến bệnh của gà sau khi CCD ở mỗi lô thí nghiệm là khác nhau. Nhìn chung, gà ốm và chết với những biểu hiện lâm sàng điển hình của CGC như ủ rũ, tím tái mào, tích, nằm bẹp, liệt chân, chảy dịch từ mũi và miệng. Tỷ lệ sống sót sau khi CCD cũng khác nhau, thể hiện trên hình 3.



Hình 3. Tỷ lệ sống sót của các nhóm gà thí nghiệm sau khi công cường độc

- Nhóm gà được tiêm vaccin Navet-Vifluvac: Triệu chứng CGC xuất hiện 5 ngày sau khi CCĐ. Tỷ lệ sống sót là 70% (7/10 con) sau 10 ngày theo dõi.

- Nhóm gà được tiêm vaccin Re-5: Một số gà xuất hiện triệu chứng CGC vào ngày thứ 2 sau khi CCĐ. Sau 10 ngày theo dõi, tỷ lệ gà sống sót là 70% (7/10 con).

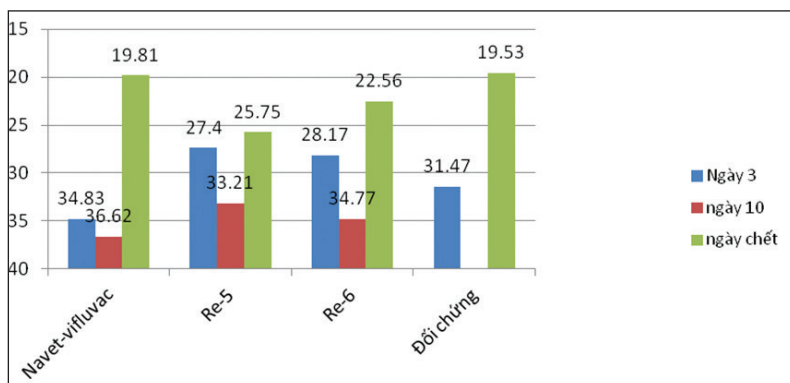
- Nhóm gà được tiêm vaccin Re-6: Thời gian ủ bệnh kéo dài đến ngày thứ 6 sau khi CCĐ. tỷ lệ gà sống sót là 70% (7/10 con) khi kết thúc thí nghiệm.

Kết quả trên khẳng định vaccin Navet-Vifluvac, vaccin Re-5 và Re-6 đều có khả năng

bảo hộ chống lại bệnh lâm sàng do virus H5N6 clade 2.3.4.4B gây nên với cùng tỷ lệ là 70% gà được tiêm phòng khi sử dụng liệu trình 1 liều vaccin lúc 3 tuần tuổi. Tất cả gà không được tiêm phòng đều mắc bệnh và chết 4 ngày sau công cường độc.

3.3. Bài thải virus từ gà thí nghiệm sau khi công cường độc

Ngoài tác dụng bảo hộ cho gà chống lại bệnh lâm sàng do virus cường độc gây nên, dùng vaccin CGC còn làm giảm lượng virus và thời gian bài thải virus. Khả năng này được đánh giá thông qua định lượng virus trong mẫu swab hầu họng của gà sau khi CCĐ, chỉ số Ct trung bình tại các thời điểm lấy mẫu được thể hiện trên hình 4.



Hình 4. Mức độ bài thải virus của các nhóm gà sau công cường độc

- Nhóm gà được tiêm vaccin Navet-Vifluvac: Phát hiện virus với mức độ thấp từ mẫu swab lấy vào thời điểm 3 và 10 ngày sau khi CCĐ với chỉ số Ct tương ứng là 34,83 và 36,62. Ta thấy rằng, vaccin Navet-Vifluvac, ngoài khả năng bảo hộ chống lại bệnh lâm sàng do virus H5N6 clade 2.3.4.4B gây nên với tỷ lệ là 70%, còn làm giảm rất lớn lượng virus nhân lên trong cơ thể và bài thải ra môi trường sau CCĐ. Ngược lại, mức độ bài thải virus từ những gà chết lại rất lớn ($Ct=19,81$) do ở những gà này không có khả năng bảo hộ của vaccin nên virus được nhân lên, gây bệnh và bài thải mạnh mẽ ra môi trường. Thực tế này đề ra một yêu cầu rất lớn trong công tác vệ sinh tiêu độc tại các ổ dịch CGC trong thực tiễn.

- Nhóm gà được tiêm vaccin Re-5: Lượng virus bài thải của nhóm gà này vào ngày thứ 3 sau khi CCĐ và từ những gà sống sót (7/10 con) vào ngày thứ 10 sau khi CCĐ là nhiều nhất trong 3 lô gà đã được tiêm vaccin với chỉ số Ct tương ứng là 27,4 và 33,21. Mặc dù lượng virus nhân lên (trong cơ thể) và bài thải ra môi trường còn cao, nhưng nó có xu hướng giảm rõ rệt ở ngày thứ 10 sau CCĐ (gần mức âm tính). Với những gà chết, lượng virus nhân lên và bài thải rất lớn ($Ct=25,75$), điều này cũng phù hợp với kết quả bảo hộ của vaccin và độc lực của virus (Nguyễn Đăng Thọ và cs., 2016) [5].

- Nhóm gà được tiêm vaccin Re-6: Virus

được bài thải ở mức độ cao vào thời điểm 3 ngày sau khi CCD (Ct=28,17). Vào thời điểm 10 ngày sau khi CCD, chỉ còn một lượng nhỏ virus được bài thải với chỉ số Ct=34,77 (gần mức âm tính) từ những gà sống sót. Điều này minh chứng khả năng làm giảm lượng virus bài thải ra môi trường của vacxin sử dụng. Còn với những gà chết, lượng virus nhân lên và bài thải rất lớn (Ct=22,56) do cơ thể không có khả năng bảo hộ chống lại bệnh lâm sàng do virus H5N6 clade 2.3.4.4B gây nên.

- Gà đối chứng: Tuy virus bài thải với lượng thấp vào thời điểm 3 ngày sau khi CCD, nhưng do cơ thể gà không có khả năng bảo hộ chống lại bệnh lâm sàng do virus H5N6 clade 2.3.4.4B gây nên, dẫn đến mức độ virus được nhân lên và bài thải ra môi trường rất lớn, thể hiện qua chỉ số Ct từ gà chết thấp (19,53).

Từ hình 4, có thể nhận thấy: Gà của cả 3 nhóm vacxin vẫn bài thải virus vào ngày thứ 10 sau khi CCD, tuy nhiên lượng virus bài thải ra môi trường đã giảm rõ rệt, đặc biệt là nhóm gà được tiêm vacxin Navet-Viflucac (giảm nhiều nhất).

IV. KẾT LUẬN

- Vacxin Navet-Viflucac, Re-5 và Re-6 đều có khả năng kích thích tạo miễn dịch kháng virus cúm sau khi tiêm 1 liều cho gà 3 tuần tuổi, với HGKT tương ứng là $4,7\log_2$, $7,8\log_2$ và $5,3\log_2$.

- Vacxin Navet-Viflucac, Re-5 và Re-6 đều bảo hộ được 70% số gà được tiêm phòng khi CCD với virus cúm A/H5N6 clade 2.3.4.4B.

- Cả 3 loại vacxin đều làm giảm lượng virus bài thải từ gà được tiêm phòng, sau đó được CCD với virus cúm A/H5N6 clade 2.3.4.4B.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này sử dụng kinh phí của đề tài độc lập cấp quốc gia mã số ĐTĐL.CN-10/15 “Nghiên cứu sự phân bố các biến chủng (clade) mới của virus cúm A/H5N1 trên đàn gia cầm ở Việt Nam làm cơ sở cho việc phòng chống dịch bệnh đạt hiệu quả cao”. Các tác giả cảm ơn sự giúp đỡ kỹ thuật của cán bộ Phòng Virus – Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Khoa học và Công nghệ (2014). TCVN 8400-26:2014, Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán – Phần 26: Bệnh cúm gia cầm H5N1.
2. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2005), Kế hoạch dự phòng chống dịch cúm gia cầm chủng độc lực cao tại Việt Nam, Hà Nội.
3. Cục Thú y (2017). Báo cáo tóm tắt kết quả công tác thú y 2017 và kế hoạch công tác 2018.
4. Nguyễn Hoàng Đăng, Tô Long Thành, Nguyễn Đăng Thọ, Lương Văn Hảo, Âu Xuân Khoa, Nguyễn Văn Lâm, Mai Thùy Dương (2017). Hiệu lực một số loại vacxin cúm gia cầm sử dụng trên gà và vịt chống lại virus cúm A/H5N6 tại Việt Nam, *Khoa học kỹ thuật Thú y*, 2017 số 6, 5-15.
5. Nguyễn Đăng Thọ, Nguyễn Hoàng Đăng, Đàm Thị Vui, Đỗ Thị Hoa, Mai Thùy Dương, Nguyễn Thị Điệp, Nguyễn Viết Không, Tô Long Thành (2016). Virus cúm gia cầm độc lực cao H5N6 ở Việt Nam năm 2014, *Khoa học kỹ thuật Thú y*, Tập XXIII số 1 - 2016, tr 18 - 28.
6. FAO (2004). FAO, OIE & WHO: Technical consultation on the Control of Avian Influenza, Animal health special report.
7. O.I.E. (2012). Avian Influenza Disease. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2012).

Ngày nhận 22-1-2018

Ngày phản biện 31-1-2018

Ngày đăng 1-7-2018