

ĐÁNH GIÁ CHỈ TIÊU AN TOÀN VÀ ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA LỢN ĐƯỢC TIÊM VACCIN LỞ MỒM LONG MÓNG VÔ HOẠT NHỮ DẦU VÀ KEO PHÈN NHỊ GIÁ TYPE O VÀ A

*Nguyễn Thị Thuý Quỳnh¹, Đồng Thị Hồng Liên¹,
Đông Văn Trường¹, Cao Văn Hùng¹, Nguyễn Văn Giáp²*

TÓM TẮT

Kết quả nghiên cứu chỉ tiêu an toàn và đáp ứng miễn dịch của lợn được tiêm vaccin lở mồm long móng (LMLM) vô hoạt nhũ dầu và keo phèn nhĩ giá type O và A cho thấy cả hai loại vaccin đều an toàn trong thời gian theo dõi sau khi tiêm chủng (p.v), không có sự sai khác về thân nhiệt so với nhóm đối chứng và tất cả lợn không xuất hiện triệu chứng lâm sàng của bệnh LMLM. Tuy nhiên, đáp ứng miễn dịch của lợn được tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhĩ giá type O và A nhũ dầu (nhóm L2-ND) mạnh hơn so với lợn được tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhĩ giá type O, A keo phèn (nhóm L2-KP), hiệu giá kháng thể (HGKT) có sự sai khác ($P < 0,05$). Đối với lợn thuộc nhóm L2-ND, HGKT đặc hiệu tăng đều. Tại thời điểm 56 ngày p.v, HGKT trung hoà đối với virus type A là $2,26 \pm 0,11$; với virus type O là $2,49 \pm 0,25$ và HGKT ELISA đối với virus type A là $2,35 \pm 0,13$ và type O là $2,52 \pm 0,16$. Đáp ứng kháng thể kéo dài khoảng 6 tháng p.v. Trong khi đó, đối với nhóm lợn L2-KP, HGKT cao nhất tại thời điểm 42 ngày p.v; đối với virus type A và O là $1,71 \pm 0,13$ và $1,74 \pm 0,08$; kháng thể ELISA với virus type A và O là $1,86 \pm 0,17$ và $1,86 \pm 0,09$. Tuy nhiên, HGKT giảm dần trong thời gian theo dõi trên nhóm lợn được tiêm vaccin vô hoạt keo phèn nhĩ giá type O và A. Vì vậy, đối với lợn nên sử dụng vaccin LMLM vô hoạt nhĩ giá type O, A nhũ dầu và sau 6 tháng nên tiêm nhắc lại; không sử dụng vaccin LMLM vô hoạt keo phèn cho lợn.

Từ khóa: Lở mồm long móng, lợn, vaccin, nhũ dầu kép, keo phèn.

Evaluation on safety index and immune response of pig vaccinated with type O and A, bivalent, oil emulsion and aluminum hydroxide gel, inactivated FMD vaccine

*Nguyen Thi Thuy Quynh, Dong Thi Hong Lien,
Dong Van Truong, Cao Van Hung, Nguyen Van Giap*

SUMMARY

The result of study on safety index and immune response of the pigs vaccinated with the type O and A, bivalent, oil emulsion and aluminum hydroxide gel, inactivated FMD vaccines showed that both vaccines were safe during the monitoring time after vaccination (p.v), there was not different in the body temperature between the experimental and the control pigs and all the pigs did not appear clinical signs of FMD. However, the immune response of the pigs injected with type O and A, bivalent, oil emulsion, inactivated, FMD vaccine (L2-ND group) was stronger than that of the pigs injected with the type O and A, bivalent, aluminum hydroxide gel, inactivated, FMD vaccine (L2-KP group), antibody titer (Ab) was different ($P < 0.05$). For the L2-ND pig group, the specific Ab increased steadily. At 56 days of p.v, the neutralizing antibody titer for type A virus was 2.26 ± 0.11 ; for type O virus was 2.49 ± 0.25 and ELISA titer for type A virus was 2.35 ± 0.13 and for type O virus was 2.52 ± 0.16 . Antibody response continued for about 6 months of p.v. Meanwhile, for the L2-KP pig group, the highest Ab was at 42 days of p.v; for type A and O virus was 1.71 ± 0.13 and 1.74 ± 0.08 , respectively; ELISA titer for type A and O virus was 1.86 ± 0.17 and 1.86 ± 0.09 , respectively. However, the Ab titer decreased during the monitoring time of p.v in the pig group vaccinated with the type O and A, bivalent, aluminum hydroxide gel, inactivated, FMD vaccine. Therefore, it is recommended that the type O and A, bivalent, oil emulsion, inactivated, FMD vaccine should be used and the second dose of this vaccine should be injected after 6 months; the type O and A, bivalent, aluminum hydroxide gel, inactivated, FMD vaccine will not use for pigs.

Keywords: Foot and mouth disease, pig, vaccine, oil emulsion, aluminum hydroxide gel.

¹ Công ty cổ phần Phát triển công nghệ nông thôn (RTD)

² Học viện Nông nghiệp Việt Nam

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lở mồm long móng (LMLM) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính, có khả năng lây lan nhanh ở các loài động vật guốc chẵn như trâu, bò, lợn, dê và cừu... Bệnh do virus LMLM gây ra. Virus LMLM thuộc họ *Picornaviridae*, chi *Aphthovirus*, đường kính 20-28 nm, không có vỏ bọc. Có 7 serotype của virus LMLM đã được xác định, bao gồm O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 và Asia1. Giữa các serotype, trình tự VP1 khác nhau trong khoảng 30-50% và không có miễn dịch chéo giữa các type (Jamal và Belsham, 2013).

Ở Việt Nam, bệnh LMLM xuất hiện từ năm 1898 và cho đến nay đã có 3 type virus lưu hành là O, A và Asia1 được phát hiện (Đào Trọng Đạt, 2000). Trong đó, ở Việt Nam từ giai đoạn năm 2016 cho đến nay đang lưu hành các dòng virus type O: Cathay, ME-SA/PanAsia, ME-SA/Ind-2001d, ME-SA/Ind-2001e, SEA/Mya-98, đối với type A thuộc topotype AISIA (Sea-97) và có 1 phân type thuộc genotype IX (Blacksell *et al.*, 2019). Bệnh gây thiệt hại lớn về kinh tế và nhà nước hàng năm đã chi một khoản ngân sách lớn cho công tác phòng và khống chế dịch bệnh. Theo số liệu từ Cục Thú y, tính từ năm 2010 – 2016, Việt Nam đã phải nhập khẩu trên 163 triệu liều vaccin phòng bệnh LMLM, trung bình khoảng 10 triệu USD/năm (Cục Thông tin KH&CN quốc gia, 2020). Giải pháp sử dụng vaccin chế tạo bằng chủng virus phân lập từ thực địa được xem là một trong những giải pháp tối ưu trong việc phòng chống bệnh LMLM hiện nay ở nước ta.

Hầu hết các vaccin LMLM được vô hoạt bằng BEI (binary ethylenimine) và bổ sung chất bổ trợ là nhôm hydroxit/saponin hoặc nhũ dầu. Chất bổ trợ nhũ dầu thường được ưa thích hơn do vaccin tạo ra đáp ứng miễn dịch kéo dài hơn so với vaccin keo phèn (Doel, 2003).

Trong Chương trình phát triển sản phẩm quốc gia đến năm 2020, Bộ Khoa học và Công nghệ đã cấp kinh phí cho công ty RTD thực hiện đề tài: “*Nghiên cứu, chế tạo vaccin vô hoạt nhũ dầu, keo phèn phòng bệnh lở mồm long móng đa type O và A cho gia súc*”. Trong bài viết này, chúng tôi trình bày các kết quả về chỉ tiêu an toàn và đáp ứng miễn dịch của lợn khi được tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhũ giá type O, A nhũ dầu và keo phèn sản xuất tại công ty.

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

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Kiểm tra an toàn vaccin LMLM vô hoạt nhũ

dầu và keo phèn nhũ giá type O, A trên lợn.

- Đánh giá đáp ứng miễn dịch của lợn khi được tiêm một trong hai loại vaccin trên.

2.2. Nguyên liệu

- Giống virus LMLM: Virus A/FMD/Avac-2 (ký hiệu A2) thuộc genotype IX và virus O/FMD/Avac-3 (ký hiệu O3) thuộc topotype ME – SA, dòng PanAsia. Cả hai chủng virus này do Công ty RTD phân lập. Giống virus có TCID₅₀ là 10⁷/ml.

- Vaccin LMLM vô hoạt nhũ dầu nhũ giá type O và A được chuẩn bị từ kháng nguyên A2 và O3 phối trộn với nhũ kép Montanide ISA 201VG (hãng Seppic cung cấp).

- Vaccin LMLM vô hoạt keo phèn nhũ giá type O và A được chuẩn bị với nồng độ kháng nguyên A2 và O3 tương tự để so sánh hai loại vaccin và phối trộn với keo phèn Al(OH)₃ (công ty SPI Pharma cung cấp).

- Lợn: 50 con, 4-5 tuần tuổi, chưa tiêm vaccin LMLM và không có kháng thể kháng virus LMLM.

- Tế bào BHK21 dạng treo để sản xuất kháng nguyên LMLM và tế bào BHK21 dạng một lớp để xác định hiệu giá virus LMLM và tiến hành phản ứng trung hoà virus.

- Một số nguyên vật liệu, hoá chất dùng cho phản ứng LP – ELISA.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Đánh giá chỉ tiêu an toàn của vaccin LMLM vô hoạt

Kiểm tra an toàn theo TCVN 8685:10-2014. Tóm tắt như sau: Tiêm cho 10 lợn/loại vaccin, mỗi con 2 liều vaccin (4ml/con). Nhóm đối chứng gồm 5 lợn không được tiêm vaccin. Hàng ngày, sáng từ 7-9 giờ, chiều từ 16-18 giờ, đo thân nhiệt qua trực tràng và quan sát lợn thí nghiệm cùng 5 lợn đối chứng trong 14 ngày.

Yêu cầu: Vaccin đạt tiêu chuẩn an toàn khi lợn sống khỏe, không có bất kỳ triệu chứng cục bộ như tổn thương ở lưỡi, chân hay triệu chứng toàn thân: Sốt, ủ rũ, mệt mỏi... trong thời gian theo dõi.

2.3.2. Đáp ứng kháng thể và độ dài miễn dịch của lợn sau khi tiêm vaccin

Tiêm 10 lợn/loại vaccin, mỗi con 1 liều vaccin (2 ml/con). Sau 4 tuần tiêm nhắc lại mũi 2 (2 ml/con). Lấy máu tại các thời điểm 0, 7, 14, 21, 28, 35, 49, 56 ngày sau khi tiêm để

kiểm tra đáp ứng kháng thể kháng virus LMLM bằng phương pháp trung hòa và phương pháp ELISA.

Độ dài miễn dịch được xác định thông qua đáp ứng kháng thể tại các thời điểm trong vòng 6 tháng sau mũi tiêm thứ 2.

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm

TT	Nhóm	Kiểm tra an toàn	Kiểm tra hiệu lực
1	Lợn được tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhĩ giá type O, A nhũ dầu	Nhóm L1- ND: 10 lợn, tiêm 4ml/con, tiêm 1 mũi	Nhóm L2- ND: 10 lợn, tiêm 2 ml/con, tiêm 2 mũi, mũi 2 tiêm vào lúc 28 ngày sau mũi 1
2	Lợn được tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhĩ giá type O, A keo phen	Nhóm L1- KP: 10 lợn, tiêm 4 ml/con, tiêm 1 mũi	Nhóm L2- KP: 10 lợn, tiêm 2 ml/con, tiêm 2 mũi, mũi 2 tiêm vào lúc 28 ngày sau mũi 1
3	Đối chứng	Nhóm L- DC1: 5 con, không tiêm	Nhóm L- DC2: 5 con, không tiêm

2.3.3. Phương pháp trung hoà virus trên tế bào theo TCVN 8685:10 - 2014

Quá trình được thực hiện trên đĩa nuôi cấy 96 giếng, sử dụng tế bào BHK21 với nồng độ tế bào là 50.000 tế bào/giếng. Virus LMLM chủng O/FMD/Avac3 và virus LMLM chủng A/FMD/Avac2 được pha loãng trong dung dịch DMEM, lượng virus để trung hòa là 100 TCID₅₀/giếng. Huyết thanh đã được xử lý bỏ thể ở 56°C/30 phút, pha loãng theo cơ số 2 từ 1/4 đến 1/512. Mỗi bậc pha loãng huyết thanh được lặp lại 2 lần (2 giếng). Virus trộn với huyết thanh theo tỷ lệ 1:1, ủ ở 37°C/60 phút rồi thêm tế bào với nồng độ 50.000 tế bào/giếng, ủ ở tủ ấm 37°C, 5% CO₂. Đọc kết quả sau 2 ngày.

Hiệu giá trung hòa 50% được tính theo phương pháp Spearman-Kärber (Karber, 1931):

$$\text{LogVNT}_{50} = X_0 + d/2 - d \sum r_i/n_i$$

Trong đó:

X₀ là log₁₀ của nghịch đảo độ pha loãng huyết thanh cao nhất

d: Log₁₀ của khoảng cách pha loãng

r: tổng số giếng dương tính

n: số giếng cho một độ pha loãng

Kết quả: Dương tính: Tế bào ở giếng phản ứng không bị phá hủy; âm tính: Tế bào ở giếng phản ứng bị phá hủy, bong khỏi đáy giếng, để lại khoảng trống.

Kết luận: Âm tính: LogVNT₅₀ < 1,21 (1/16); dương tính: LogVNT₅₀ ≥ 1,65 (1/45); nghi ngờ: LogVNT₅₀ trong khoảng 1,21 (1/16) đến 1,5 (1/32). Thực hiện lại phản ứng đối với huyết thanh nghi ngờ; nếu kết quả cao hơn 1,21 (1/16) được xem là dương tính, ngược lại là âm tính (OIE, 2018).

2.3.4. Định lượng kháng thể LMLM bằng phản ứng LP-ELISA (Liquid phase blocking ELISA)

Phương pháp được thực hiện theo hướng dẫn kèm theo bộ kit LPBE test kit for FMDV antibody detection (Pirbright, UK). Phủ đĩa ELISA bằng Rabbit antisera trong coating buffer với nồng độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất (1/1000). Huyết thanh đã pha loãng theo cơ số 2 (từ nồng độ 1/8 đến 1/512), trộn huyết thanh pha loãng từ 1/16 đến 1/512 với kháng nguyên (O1 manisa và A22/Iraq được pha loãng 1/100) theo tỷ lệ 1:1, trong đĩa 96 giếng chữ U. Sau khi ủ đĩa ở 2-8°C qua đêm, loại bỏ dung dịch trong đĩa ELISA. Rửa đĩa bằng dung dịch PBS, pH = 7,4. Chuyển hỗn hợp phản ứng kháng nguyên/huyết thanh vào đĩa ELISA, ủ lắc 37°C/1 h. Sau đó bổ sung kháng thể nhận biết (guinea pig antisera với nồng độ 1/1000) vào các giếng. Sau khi ủ ở 37°C/1 h, bổ sung tiếp rabbit anti guinea pig HRP (với nồng độ 1/1000) vào các giếng. Tiếp tục ủ ở 37°C/1 h và cho dung dịch cơ chất (Ortho phenyl enediamin- ODP) vào các giếng. Sau mỗi bước ủ, chuyển sang phản ứng tiếp theo, loại bỏ hết dung dịch trong đĩa ELISA và rửa đĩa bằng PBS, pH=7,4. Ủ cơ chất ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và bổ sung ngay dung dịch Stop solution. Dừng phản ứng và đọc kết quả bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 492 nm.

Phân tích kết quả: Giá trị PI (phần trăm ức chế) của đối chứng được tính bằng công thức: PI=100-(OD đối chứng*100)/OD trung bình của đối chứng kháng nguyên; giá trị PI của mẫu được tính bằng công thức: PI=100-(OD mẫu*100)/OD trung bình của đối chứng kháng nguyên.

Đọc kết quả: Dương tính: PI ≥ 50%, âm tính: PI < 50%.

Kết luận: Âm tính: ELISA (log₁₀) < 1,6 (1/40);

dương tính ELISA ($\log_{10} \geq 1,95$ (1/90); nghi ngờ: ELISA trong khoảng 1,6 (1/40) đến 1,95 (1/90). Thực hiện lặp lại phản ứng đối với huyết thanh nghi ngờ; nếu kết quả cao hơn 1,6 (1/40) được xem là dương tính, ngược lại là âm tính (OIE, 2018).

2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu

- Xử lý số liệu bằng phương pháp thống kê sinh học và xử lý trên phần mềm Excel.

- So sánh các giá trị trung bình bằng phân tích phương sai ANOVA một nhân tố với phép thử Turkey.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kiểm tra an toàn

**Kiểm tra an toàn vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A nhũ dầu*

Sau khi được tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A nhũ dầu, lợn được theo dõi và ghi chép nhiệt độ hàng ngày đối với cả hai nhóm (thí nghiệm và đối chứng) trong vòng 14 ngày. Kết quả được thể hiện trên bảng 2.

Bảng 2. Thân nhiệt của lợn sau khi tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A nhũ dầu

Thời gian theo dõi (ngày)	Thân nhiệt lợn (°C)		P
	Nhóm L1- ND	Nhóm L- DC1	
1	39,76 ± 0,29	39,2 ± 0,07	0,07
2	39,43 ± 0,13	39,2 ± 0,14	0,12
3	38,98 ± 0,13	38,8 ± 0,28	0,07
4	39,18 ± 0,26	39,1 ± 0,14	0,70
5	39,1 ± 0,10	39 ± 0,28	0,48
6	39,05 ± 0,11	39,03 ± 0,04	0,82
7	39,24 ± 0,15	39,15 ± 0,07	0,47
8	39,14 ± 0,15	39,2 ± 0,14	0,65
9	39,22 ± 0,08	39,15 ± 0,07	0,35
10	39,25 ± 0,12	39,1 ± 0,14	0,22
11	39,15 ± 0,15	39,15 ± 0,07	1
12	39,04 ± 0,30	39 ± 0,0	0,86
13	39,1 ± 0,19	39,05 ± 0,21	0,77
14	39,2 ± 0,16	39,15 ± 0,07	0,69

Nhóm L1 – ND: lợn tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A nhũ dầu; nhóm L- DC1: lợn đối chứng

Kết quả cho thấy, nhóm lợn thí nghiệm có nhiệt độ trung bình dao động trong khoảng từ 38,98 - 39,76°C. Sau khi tiêm vaccin, lợn ở nhóm thí nghiệm đã có thân nhiệt tăng nhẹ ở ngày thứ 1 với nhiệt độ trung bình đo được là 39,76°C và sang ngày thứ 2, thân nhiệt giảm, trung bình là 39,43°C. Nhóm đối chứng thân nhiệt trung bình duy trì ở mức 39,15°C. Từ ngày thứ 3 trở đi, thân nhiệt trung bình ở nhóm thí nghiệm bắt đầu giảm dần về ngưỡng sinh lý bình thường, nằm trong khoảng 38,98 - 39,25°C. Trong khi đó, nhóm đối chứng thân nhiệt vẫn duy trì ổn định, dao động trong khoảng 38,8 - 39,2°C suốt thời gian 14 ngày theo dõi. Các giá trị P tính được đều > 0,05; nghĩa là không có sự sai khác có ý nghĩa giữa nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng trong thời gian theo dõi.

Quan sát hai nhóm lợn trong thời gian 14 ngày cho thấy: Nhóm lợn ở lô đối chứng khỏe mạnh, không có triệu chứng bất thường. Nhóm lợn thí nghiệm được tiêm vaccin thì một số lợn chỉ có biểu hiện ít vận động hơn trong thời điểm thân nhiệt tăng. Các ngày sau đó, con vật ăn uống, khỏe mạnh bình thường. Tất cả lợn không thấy biểu hiện sưng, đỏ ở vị trí tiêm. Trong suốt thời gian theo dõi, không có bất kỳ triệu chứng bất thường hay triệu chứng điển hình của bệnh LMLM như mọc mụn nước ở miệng, lưỡi, kẽ móng và khó vận động. Phản ứng cục bộ như u hạt tại vị trí tiêm thường xuất hiện khi sử dụng chất bổ trợ nhũ dầu thế hệ trước (ví dụ như: Tá dược Freund không đầy đủ, tá dược Freund đầy đủ, Montanide MF59, AS03) (Petrovsky và Aguilar, 2004) nhưng trong nghiên cứu này, việc sử dụng nhũ dầu kép (ISA

201 VG) đã khắc phục được điều đó, không quan sát thấy phản ứng cục bộ tại vị trí tiêm. Nhiệt độ tăng nhẹ của một số lợn khi tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A nhũ dầu chỉ là phản ứng nhẹ khi tiêm vaccin (Nguyễn Bá Hiên, 2010); sau 2-3 ngày, thân nhiệt trở lại bình thường. Phản ứng này cũng nằm trong giới hạn bình thường khi tiêm vaccin nhũ dầu (Stils Jr, 2005). Tham chiếu tiêu chuẩn TCVN 8685-10: 2014, có thể thấy rằng vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A nhũ dầu an toàn đối với lợn.

** Kiểm tra an toàn vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A keo phèn*

Tương tự với vaccin LMLM vô hoạt nhũ dầu, lợn sau khi được tiêm vaccin LMLM nhị giá O, A keo phèn được ghi chép nhiệt độ hàng ngày đối với cả hai nhóm (thí nghiệm và đối chứng) trong vòng 14 ngày. Kết quả theo dõi thân nhiệt của 2 nhóm được thể hiện trên bảng 3.

Bảng 3. Thân nhiệt của lợn sau khi tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A keo phèn

Thời gian theo dõi (ngày)	Thân nhiệt lợn (°C)		P
	Nhóm L1-KP	Nhóm L- DC1	
1	39,78 ± 0,52	39,2 ± 0,07	0,29
2	39,51 ± 0,2	39,2 ± 0,14	0,19
3	38,98 ± 0,52	38,8 ± 0,28	0,10
4	39,4 ± 0,22	39,1 ± 0,14	0,14
5	39,2 ± 0,27	39 ± 0,28	0,43
6	39 ± 0,19	39,03 ± 0,04	0,84
7	39,15 ± 0,13	39,15 ± 0,07	1
8	39,1 ± 0,21	39,2 ± 0,14	0,29
9	39,06 ± 0,17	39,15 ± 0,07	0,51
10	39,02 ± 0,08	39,1 ± 0,14	0,37
11	39,12 ± 0,11	39,15 ± 0,07	0,74
12	39,18 ± 0,13	39 ± 0	0,12
13	39,16 ± 0,09	39,05 ± 0,21	0,34
14	39,16 ± 0,06	39,15 ± 0,07	0,85

Nhóm L1 – KP: Lợn tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A keo phèn; nhóm L- DC1: Lợn đối chứng, không tiêm

Kết quả cho thấy, nhóm lợn thí nghiệm có nhiệt độ trung bình dao động trong khoảng từ 38,98 – 39,78°C. Sau khi tiêm vaccin, thân nhiệt của một số lợn ở nhóm thí nghiệm cũng bắt đầu tăng nhẹ ở ngày thứ 1 với nhiệt độ trung bình là 39,78°C; thân nhiệt giảm dần ở ngày thứ 2, trung bình là 39,51°C. Từ ngày thứ 3 trở đi, thân nhiệt bắt đầu giảm dần; trong thời gian theo dõi, nhiệt độ dao động từ 38,98 - 39,4°C nằm trong ngưỡng sinh lý bình thường. Trong khi đó ở nhóm lợn đối chứng, thân nhiệt vẫn duy trì ổn định trong khoảng 38,8 - 39,2°C suốt thời gian 14 ngày theo dõi. Thân nhiệt của hai nhóm lợn không có sự khác biệt ($P > 0,05$).

Theo dõi biểu hiện lâm sàng trên lợn trong 14 ngày cho thấy một số lợn ít vận động khi thân nhiệt tăng

nhẹ, sau đó con vật trở lại bình thường, vị trí tiêm có biểu hiện hơi sưng nhưng chỉ trong một ngày sau tiêm và mất dần trong thời gian theo dõi, lợn không có triệu chứng bất thường hay triệu chứng điển hình của bệnh LMLM. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Valtulini *et al.* (2005). Tham chiếu TCVN 8685:10-2014, có thể thấy rằng vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A keo phèn an toàn đối với lợn.

3.2. Đáp ứng miễn dịch của lợn sau khi tiêm vaccin

Đáp ứng miễn dịch của lợn sau khi tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A nhũ dầu và keo phèn được xác định bằng phản ứng trung hoà trên tế bào, thể hiện ở bảng 4a và 4b.

Bảng 4a. Hiệu giá kháng thể trung hòa của lợn được tiêm vaccin LMLM nhị giá O, A nhũ dầu

Ngày sau tiêm	Hiệu giá kháng thể LMLM (LogVNT ₅₀)			
	Type A		Type O	
	Nhóm L2-ND	Nhóm L-DC2	Nhóm L2-ND	Nhóm L-DC2
0	< 0,9	< 0,9	< 0,9	< 0,9
7	0,9	< 0,9	0,9	< 0,9
14	0,9	< 0,9	0,9	< 0,9
21	1,11 ± 0,18	< 0,9	0,96 ± 0,08	< 0,9
28	1,23 ± 0,22	< 0,9	1,56 ± 0,08	< 0,9
35	1,53 ± 0,22	< 0,9	1,68 ± 0,13	< 0,9
42	2,04 ± 0,08	< 0,9	2,1 ± 0,24	< 0,9
49	2,2 ± 0,09	< 0,9	2,40 ± 0,24	< 0,9
56	2,26 ± 0,11	< 0,9	2,49 ± 0,25	< 0,9
70	2,26 ± 0,11	< 0,9	2,49 ± 0,25	< 0,9
84	2,25 ± 0,15	< 0,9	2,46 ± 0,13	< 0,9
98	2,2 ± 0,09	< 0,9	2,43 ± 0,27	< 0,9
112	2,16 ± 0,08	< 0,9	2,37 ± 0,22	< 0,9
126	2,13 ± 0,07	< 0,9	2,34 ± 0,27	< 0,9
140	2,10 ± 0,11	< 0,9	2,32 ± 0,08	< 0,9
154	2,10 ± 0,11	< 0,9	2,22 ± 0,25	< 0,9
168	2,07 ± 0,06	< 0,9	2,16 ± 0,25	< 0,9
182	2,04 ± 0,08	< 0,9	2,07 ± 0,25	< 0,9
196	1,95 ± 0,18	< 0,9	2,01 ± 0,23	< 0,9

Bảng 4b. Hiệu giá kháng thể trung hòa của lợn được tiêm vaccin LMLM nhị giá O, A keo phèn

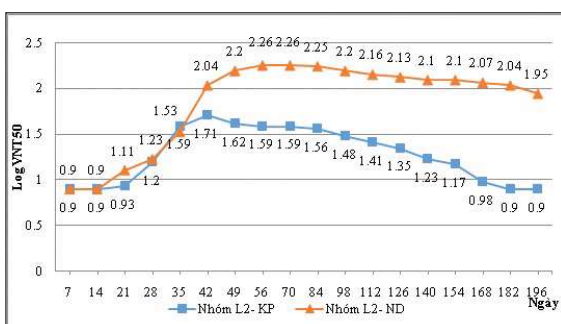
Ngày sau tiêm	Hiệu giá kháng thể LMLM (LogVNT ₅₀)			
	Type A		Type O	
	Nhóm L2-KP	Nhóm L-DC2	Nhóm L2-KP	Nhóm L-DC2
0	< 0,9	< 0,9	< 0,9	< 0,9
7	0,9	< 0,9	0,9	< 0,9
14	0,9	< 0,9	0,9	< 0,9
21	0,93 ± 0,06	< 0,9	1,02 ± 0,12	< 0,9
28	1,2 ± 0,11	< 0,9	1,32 ± 0,2	< 0,9
35	1,59 ± 0,08	< 0,9	1,62 ± 0,13	< 0,9
42	1,71 ± 0,13	< 0,9	1,74 ± 0,08	< 0,9
49	1,62 ± 0,13	< 0,9	1,59 ± 0,08	< 0,9
56	1,59 ± 0,08	< 0,9	1,56 ± 0,08	< 0,9
70	1,59 ± 0,13	< 0,9	1,56 ± 0,08	< 0,9
84	1,56 ± 0,08	< 0,9	1,47 ± 0,12	< 0,9
98	1,48 ± 0,16	< 0,9	1,39 ± 0,06	< 0,9
112	1,41 ± 0,17	< 0,9	1,23 ± 0,18	< 0,9
126	1,35 ± 0,18	< 0,9	1,20 ± 0,16	< 0,9
140	1,23 ± 0,13	< 0,9	1,29 ± 0,35	< 0,9
154	1,17 ± 0,18	< 0,9	1,14 ± 0,31	< 0,9
168	0,98 ± 0,07	< 0,9	1,11 ± 0,25	< 0,9
182	< 0,9	< 0,9	0,96 ± 0,13	< 0,9
196	< 0,9	< 0,9	0,93 ± 0,06	< 0,9

Ghi chú: Nhóm L2 – KP: lợn tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A keo phèn, nhóm L2- ND: lợn tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A nhũ dầu; nhóm L-DC2: lợn đối chứng.

Kết quả trên bảng 4a cho thấy lợn sau khi được tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhĩ giá type O, A nhũ dầu, hiệu giá kháng thể bắt đầu tăng dần tại các thời điểm lấy máu. Hiệu giá kháng thể trung hoà tại thời điểm 28 ngày p.v là $1,23 \pm 0,22$ đối với type A và $1,56 \pm 0,08$ đối với type O. Đến thời điểm 56 ngày p.v, đối với type A đạt $2,26 \pm 0,11$ và đối với type O đạt $2,49 \pm 0,25$; đều > 2 . Đáp ứng kháng thể của lợn vẫn tiếp tục tăng và duy trì ngưỡng bảo hộ trong thời gian từ 84 - 140 ngày p.v (khoảng 2- 4 tháng p.v). Tại thời điểm 140 ngày p.v kháng thể trung hoà của type A đạt $2,10 \pm 0,11$ và type O đạt $2,32 \pm 0,08$. Sau đó, kháng thể trung hoà của lợn bắt đầu có xu hướng giảm dần; tại thời điểm 196 ngày p.v (khoảng 6 tháng sau tiêm mũi 2), kháng thể chỉ đạt

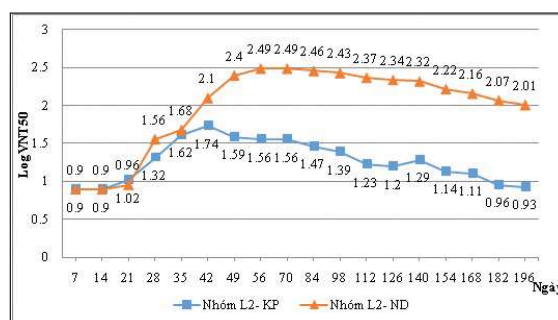
đối với type A là $1,95 \pm 0,18$ (< 2) và type O là $2,01 \pm 0,23$. Bên cạnh đó, hiệu giá kháng thể kháng virus LMLM ở lợn được tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhĩ giá type O, A keo phèn (bảng 4b) bắt đầu tăng nhanh nhưng không ổn định. Tại thời điểm 42 ngày p.v, kháng thể trung hoà đạt cao nhất đối với type A và O là $1,71 \pm 0,13$ và $1,74 \pm 0,08$. Tuy nhiên, các thời điểm lấy máu sau đó, hiệu giá kháng thể có xu hướng giảm dần; đến thời điểm 56 ngày p.v, hiệu giá kháng thể trung hoà giảm với type A là $1,59 \pm 0,08$ và type O là $1,56 \pm 0,08$; đều < 2 .

Đồ thị biểu diễn kháng thể trung hoà của lợn sau khi tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhũ dầu và keo phèn nhĩ giá type O, A được thể hiện trên hình 1a và 1b.



Hình 1a. Hiệu giá kháng thể trung hoà type A của lợn sau khi tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhũ dầu và keo phèn nhĩ giá type O, A

Nhóm L2 – KP: lợn tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhĩ giá type O, A keo phèn, nhóm L2- ND: lợn tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhĩ giá type O, A nhũ dầu



Hình 1b. Hiệu giá kháng thể trung hoà type O của lợn sau khi tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhũ dầu và keo phèn nhĩ giá type O, A



Hình 2. Hình ảnh tế bào trong phản ứng trung hòa LMLM

Đáp ứng miễn dịch của lợn sau khi tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhĩ giá type O, A nhũ dầu và keo

phèn được xác định bằng phản ứng ELISA thể hiện trong bảng 5a và 5b.

Bảng 5a. Hiệu giá kháng thể ELISA của lợn được tiêm vaccin LMLM nhĩ giá type O, A nhũ dầu

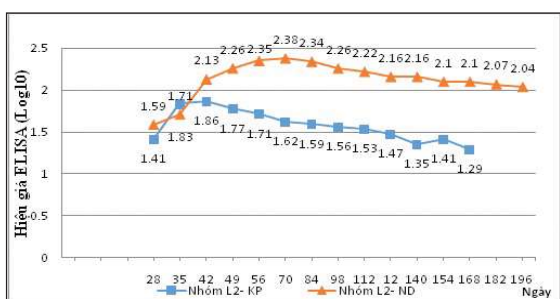
Ngày sau tiêm	Hiệu giá kháng thể ELISA (Log 10)			
	Type A		Type O	
	Nhóm L2-ND	Nhóm L-DC2	Nhóm L2-ND	Nhóm L-DC2
0	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2
7	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2
14	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2
21	1,23 ± 0,22	< 1,2	< 1,2	< 1,2
28	1,59 ± 0,07	< 1,2	1,62 ± 0,06	< 1,2
35	1,71 ± 0,33	< 1,2	1,83 ± 0,07	< 1,2
42	2,13 ± 0,07	< 1,2	2,25 ± 0,15	< 1,2
49	2,26 ± 0,11	< 1,2	2,4 ± 0,24	< 1,2
56	2,35 ± 0,13	< 1,2	2,52 ± 0,16	< 1,2
70	2,38 ± 0,12	< 1,2	2,61 ± 0,13	< 1,2
84	2,34 ± 0,17	< 1,2	2,61 ± 0,13	< 1,2
98	2,26 ± 0,11	< 1,2	2,58 ± 0,12	< 1,2
112	2,22 ± 0,13	< 1,2	2,52 ± 0,16	< 1,2
126	2,16 ± 0,09	< 1,2	2,49 ± 0,2	< 1,2
140	2,16 ± 0,09	< 1,2	2,44 ± 0,13	< 1,2
154	2,10 ± 0,11	< 1,2	2,35 ± 0,20	< 1,2
168	2,10 ± 0,11	< 1,2	2,28 ± 0,12	< 1,2
182	2,07 ± 0,07	< 1,2	2,2 ± 0,08	< 1,2
196	2,04 ± 0,08	< 1,2	2,10 ± 0,11	< 1,2

Bảng 5b. Hiệu giá kháng thể ELISA của lợn được tiêm vaccin LMLM nhĩ giá type O, A keo phèn

Ngày sau tiêm	Hiệu giá kháng thể ELISA (Log 10)			
	Type A		Type O	
	Nhóm L2-KP	Nhóm L-DC2	Nhóm L2-KP	Nhóm L-DC2
0	< 1,2	< 1,2	<0,9	< 1,2
7	< 1,2	< 1,2	0,9	< 1,2
14	< 1,2	< 1,2	0,9	< 1,2
21	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2
28	1,41 ± 0,2	< 1,2	1,41 ± 0,28	< 1,2
35	1,83 ± 0,13	< 1,2	1,83 ± 0,07	< 1,2
42	1,86 ± 0,17	< 1,2	1,86 ± 0,09	< 1,2
49	1,77 ± 0,2	< 1,2	1,71 ± 0,13	< 1,2
56	1,71 ± 0,27	< 1,2	1,71 ± 0,2	< 1,2
70	1,62 ± 0,13	< 1,2	1,68 ± 0,13	< 1,2
84	1,59 ± 0,13	< 1,2	1,65 ± 0,11	< 1,2
98	1,56 ± 0,08	< 1,2	1,62 ± 0,13	< 1,2
112	1,53 ± 0,22	< 1,2	1,53 ± 0,07	< 1,2
126	1,47 ± 0,12	< 1,2	1,50 ± 0,10	< 1,2
140	1,35 ± 0,28	< 1,2	1,41 ± 0,28	< 1,2
154	1,41 ± 0,28	< 1,2	1,38 ± 0,25	< 1,2
168	1,29 ± 0,28	< 1,2	1,36 ± 0,11	< 1,2
182	< 1,2	< 1,2	1,30 ± 0,09	< 1,2
196	< 1,2	< 1,2	1,23 ± 0,07	< 1,2

Ghi chú: Nhóm L2 – KP: lợn tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhĩ giá type O, A keo phèn; nhóm L2- ND: lợn tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhĩ giá type O, A nhũ dầu; nhóm L-DC2: lợn đối chứng.

Kết quả trên bảng 5a và 5b cho thấy, hiệu giá kháng thể của lợn được xác định bằng phương pháp ELISA tỷ lệ thuận với kháng thể trung hoà. Đáp ứng miễn dịch của lợn thuộc nhóm L2- ND, hiệu giá kháng thể tăng từ 21 ngày sau khi tiêm vaccin (type A là $1,23 \pm 0,22$ và type O $<1,2$), hiệu giá kháng thể đạt ngưỡng bảo hộ sớm tại thời điểm 42 ngày p.v (type A là $2,13 \pm 0,07$ và type O là $2,25 \pm 0,15$). Kháng thể tiếp tục duy trì ngưỡng bảo hộ trong thời gian 2- 4 tháng p.v. Đến 6 tháng sau khi tiêm mũi 2 (196 ngày), hiệu giá kháng thể chỉ là $2,04 \pm 0,08$ < 2,1 đối với type A và $2,10 \pm 0,11$ đối với type O.

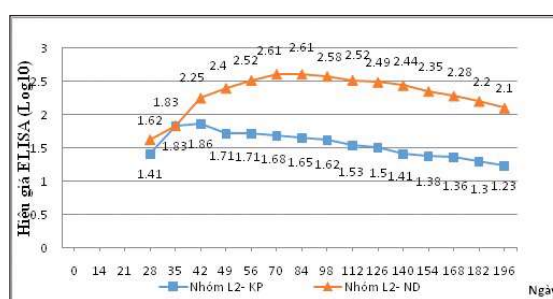


Hình 3a. Hiệu giá kháng thể ELISA type A của lợn sau khi tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhũ dầu và keo phèn nhị giá type O, A

Nhóm L2 – KP: lợn tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A keo phèn; nhóm L2- ND: lợn tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A nhũ dầu

Sự phát triển trong sản xuất vaccin LMLM hướng tới việc lựa chọn các chất bổ trợ thích hợp có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch cao và kéo dài. Chất bổ trợ được xem là yếu tố quan trọng trong việc xây dựng công thức vaccin, góp phần ảnh hưởng đến đáp ứng miễn dịch của con vật bằng cách này hay cách khác. Khi tiếp nhận vaccin, cơ thể huy động bộ máy miễn dịch để tạo kháng thể chống lại tức thời, lượng kháng thể đạt mức tối đa sau khoảng 3 tuần tiêm vaccin và nó duy trì trong một thời gian nhất định, có khi cả cuộc đời con vật (Nguyễn Bá Hiên, 2010). Đáp ứng miễn dịch của cơ thể có thể bao gồm miễn dịch tế bào, miễn dịch dịch thể (kháng thể trung hoà). Kháng thể trung hoà đóng vai trò quan trọng giúp cơ thể chống lại virus LMLM và có mối tương quan chặt chẽ đến khả năng bảo hộ của cơ thể. Tuy

Trong khi đó, lợn thuộc nhóm L2- KP tại thời điểm 42 ngày p.v, kháng thể ELISA đối với type A và O là $1,86 \pm 0,17$ và $1,86 \pm 0,09$. Tuy nhiên, tại các thời điểm lấy máu sau đó, hiệu giá kháng thể có xu hướng giảm dần, đến thời điểm 56 ngày p.v, kháng thể ELISA của type A là $1,71 \pm 0,27$ và type O là $1,71 \pm 0,2$. Đến thời điểm 196 ngày p.v (khoảng 6 tháng sau tiêm mũi 2), kháng thể ELISA của lợn đối với type A và type O đều $<1,2$. Đồ thị biểu diễn hiệu giá kháng thể ELISA của lợn sau khi tiêm vaccin LMLM nhũ dầu và keo phèn nhị giá type O, A được thể hiện trong hình 3a và 3b.



Hình 3b. Hiệu giá kháng thể ELISA type O của lợn sau khi tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhũ dầu và keo phèn nhị giá type O, A

nhien, kháng thể trung hòa đơn độc không phải lúc nào cũng có khả năng chống lại sự lây nhiễm bệnh LMLM (Becker, 1994). Trong vaccin thú y, phương pháp công cường độc là phương pháp trực tiếp hay còn được gọi là phương pháp “Gold” trong việc đánh giá khả năng bảo hộ của vaccin (Protective dose 50 – liều bảo hộ 50%). Theo OIE (2018), vaccin LMLM vô hoạt thông thường chứa ít nhất $3PD_{50}$, vaccin trong điều kiện khẩn cấp có thể lên đến $6PD_{50}$. Do điều kiện thực tế có những hạn chế về mặt kĩ thuật và an toàn sinh học nên phương pháp này rất khó thực hiện đối với việc đánh giá vaccin LMLM. Vì vậy, có thể đánh giá hiệu giá kháng thể của động vật sau tiêm bằng phương pháp gián tiếp như: phản ứng trung hòa virus trên môi trường tế bào (VNT), phương pháp ELISA phát hiện kháng thể, phương

pháp định lượng kháng thể LP- ELISA hay liều bảo hộ của vaccin trên chuột lang chưa cai sữa (Maradei *et al.*, 2008). Tuy nhiên, phương pháp trung hoà chỉ thực hiện tại cơ sở nghiên cứu và cần phải đảm bảo các yếu tố về an toàn sinh học, còn phương pháp ELISA có thể áp dụng rộng rãi tại các phòng thí nghiệm và là cơ sở để đánh giá hiệu quả sử dụng của vaccin. Trong nghiên cứu này đã sử dụng cả hai phương pháp đánh giá gián tiếp là phương pháp trung hoà trên tế bào (VNT) và phương pháp ELISA. Kết quả cho thấy, lợn được tiêm cả hai loại vaccin LMLM có cùng nồng độ kháng nguyên nhưng với chất bổ trợ khác nhau đều có đáp ứng miễn dịch. Hiệu giá kháng thể trung hoà tỷ lệ thuận với hiệu giá kháng thể ELISA. Hiệu giá kháng thể trung hoà và hiệu giá kháng thể ELISA bắt đầu xuất hiện từ ngày 21 p.v, hiệu giá kháng thể ELISA đạt dương tính tại thời điểm 28 ngày p.v đối với lợn thuộc nhóm L2-ND (hiệu giá kháng thể type A là $1,59 \pm 0,07$ và type O là $1,62 \pm 0,06$). Kết quả hiệu giá kháng thể trung hoà của hai nhóm vaccin không có sự sai khác đến ngày thứ 35 p.v ($P > 0,05$). Tuy nhiên, đến thời điểm 42 ngày p.v, hiệu giá kháng thể của hai nhóm đã có sự sai khác ($P < 0,05$). Đáp ứng kháng thể ở nhóm L2-KP tăng nhanh hơn so với nhóm lợn L2-ND, tại thời điểm 42 ngày p.v, kháng thể nhóm L2-KP đạt cực đại nhưng vẫn dưới ngưỡng bảo hộ (VNT < 2) (TCVN 8685, 2014), kháng thể giảm dần trong thời gian theo dõi. Đối với nhóm lợn L2-ND, hiệu giá kháng thể tiếp tục tăng đều và duy trì ngưỡng bảo hộ đến tháng thứ 5 (168 ngày) sau tiêm mũi 2, đến tháng thứ 6 hiệu giá kháng thể của type A dưới ngưỡng bảo hộ (VNT < 2 , hiệu giá kháng thể ELISA $< 2,1$). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu trước đây cho rằng miễn dịch tạo bởi vaccin nhũ dầu thường chỉ kéo dài được 6 tháng, đến thời điểm này con vật nên được tiêm nhắc lại (Golde *et al.*, 2005). Lê Trần Tiên (2017) cũng cho rằng lợn được tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhũ dầu đơn giá và nhị giá type O có độ dài miễn dịch kéo dài khoảng 6 tháng khi hiệu giá kháng thể được đánh giá bằng cả hai phương pháp VNT và phương pháp ELISA. Trong khi đó, nhóm đối chứng (L-DC2) hiệu giá không thay đổi trong suốt thời gian theo dõi. Kết quả này cho thấy, vaccin LMLM

dùng chất bổ trợ nhũ dầu hầu hết thành công ở đa số các loài và có đáp ứng miễn dịch chậm hơn vaccin keo phèn nhưng kéo dài (Doel, 2003). Vaccin LMLM dùng chất bổ trợ có công thức bổ trợ nhôm hydroxit và/hoặc saponin thông thường chỉ có khả năng bảo vệ ở đa số động vật nhai lại (trâu/bò, cừu và dê) (Barei *et al.*, 1979), đáp ứng miễn dịch kém trên lợn.

IV. KẾT LUẬN

Từ kết quả thu được, có thể kết luận rằng vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A nhũ dầu và keo phèn đều an toàn đối với lợn. Đáp ứng miễn dịch của nhóm lợn được tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A nhũ dầu cao hơn nhóm lợn được tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhị giá type O, A keo phèn và sau 6 tháng nên tiêm nhắc lại. Vì vậy, chúng tôi khuyến cáo nên tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhị giá O, A nhũ dầu cho lợn, không nên tiêm vaccin LMLM vô hoạt nhị giá O, A keo phèn.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã cung cấp kinh phí thực hiện đề tài; các tổ chức, cá nhân đã giúp đỡ trong quá trình thực hiện các nội dung nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đào Trọng Đạt, 2000. Góp phần vào việc đấu tranh phòng chống bệnh LMLM. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y* 2, tr. 6-7.
2. Cục Thông tin KHCN quốc gia, 2020. *Nghiên cứu, chế tạo vaccin vô hoạt nhũ dầu phòng bệnh Lở mồm Long móng type O cho gia súc*. <<http://www.most.gov.vn/vn/tin-tuc/17669/nghien-cuu--che-cao-vac-xin-vo-hoat-nhu-dau-phong-benh-lo-mom-long-mong-type-o-cho-gia-suc.aspx>>.
3. Lê Trần Tiên, 2017. *Nghiên cứu, chế tạo vaccin nhũ dầu phòng bệnh lở mồm long móng tít O cho gia súc*. Trong dự án khoa học và công nghệ. Công ty cổ phần và phát triển công nghệ nông thôn, Hưng Yên. tr. 167-170.
4. Nguyễn Bá Hiên, 2010. Công nghệ chế tạo và sử dụng vaccin thú y ở Việt Nam. *Nhà xuất bản Nông nghiệp*, Hà Nội. tr. 5-80.
5. Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8685-10:2014. Quy

- trình kiểm nghiệm vaccin - phần 10: Vaccin vô hoạt phòng bệnh Lở mồm long móng (FMD).
6. Barei, S., Panina, G., Orfei, Z., Nardelli, L., Castelli, S., 1979. Comparison of the potency for cattle of trivalent FMD vaccines adjuvanted by aluminum hydroxide saponin or oil emulsion. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B* 26, pp. 454-460.
 7. Becker, Y., 1994. Need for cellular and humoral immune responses in bovines to ensure protection from foot-and-mouth disease virus (FMDV - a point of view. *Virus genes* 8, pp.199-214.
 8. Blacksell, S.D., Siengsan-Lamont, J., Kamolsiripichaiorn, S., Gleeson, L.J., Windsor, P.A., 2019. A history of FMD research and control programmes in Southeast Asia: lessons from the past informing the future. *Epidemiology & Infection* 147.
 9. Collen, T., Baron, J., Childerstone, A., Corteyn, A., Doel, T., Flint, M., Garcia-Valcarcel, M., Parkhouse, R., Ryan, M., 1998. Heterotypic recognition of recombinant FMDV proteins by bovine T-cells: the polymerase (P3Dpol) as an immunodominant T-cell immunogen. *Virus research* 56, pp. 125-133.
 10. Doel, T., 2003. FMD vaccines. *Virus research* 91, 81.
 11. Golde, W.T., Pacheco, J.M., Duque, H., Doel, T., Penfold, B., Ferman, G.S., Gregg, D.R., Rodriguez, L.L., 2005. Vaccination against foot-and-mouth disease virus confers complete clinical protection in 7 days and partial protection in 4 days: use in emergency outbreak response. *Vaccine* 23, pp. 5775-5782.
 12. Jamal, S.M., Belsham, G.J., 2013. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet Res* 44, pp. 116.
 13. Karber, G., 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für experimentelle pathologie und pharmacologie* 162, pp. 480-483.
 14. Maradei, E., La Torre, J., Robiolo, B., Esteves, J., Seki, C., Pedemonte, A., Iglesias, M., D'Aloia, R., Mattion, N., 2008. Updating of the correlation between IpELISA titers and protection from virus challenge for the assessment of the potency of polyvalent aphthovirus vaccines in Argentina. *Vaccine* 26, pp. 6577-6586.
 15. OIE, 2018. Foot and mouth disease. Chapter 3.01.08.
 16. Petrovsky, N., Aguilar, J.C., 2004. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and cell biology* 82, pp. 488-496.
 17. Stills Jr, H.F., 2005. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR journal* 46, pp. 280-293.
 18. Valtulini, S., Macchi, C., Ballanti, P., Cherel, Y., Laval, A., Theaker, J., Bak, M., Ferretti, E., Morvan, H., 2005. Aluminium hydroxide-induced granulomas in pigs. *Vaccine* 23, pp. 3999-4004.
- Ngày nhận 21-5-2020
 Ngày phản biện 16-6-2020
 Ngày đăng 1-9-2020