

ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH Ở HEO SAU CAI SỮA SAU TIÊM 2 LOẠI VACCIN LỞ MỒM LONG MÓNG 6PD₅₀ VÀ 3PD₅₀

Nguyễn Ngọc Hải¹, Võ Thị Kiều Oanh²

TÓM TẮT

Vaccin LMLM có 2 loại: vaccin tiêu chuẩn (3PD₅₀) và vaccin đáp ứng miễn dịch cao (6PD₅₀). Vaccin LMLM 6PD₅₀ có thể nâng cao hiệu quả bảo hộ chống lại các chủng virus LMLM khác với những topotype khác nhau. Kỹ thuật realtime RT-PCR là kỹ thuật tiêu chuẩn, được sử dụng thường quy trong xét nghiệm, chẩn đoán bệnh LMLM. Dựa trên nguyên tắc định lượng của kỹ thuật realtime RT-PCR, nghiên cứu đã phân tích chỉ số Ct của kết quả xét nghiệm realtime RT-PCR đối với 2 loại vaccin LMLM thương mại phổ biến ở Việt Nam hiện nay, đó là 6PD₅₀ và 3PD₅₀. Vaccin đáp ứng miễn dịch cao (6PD₅₀) có chỉ số Ct thấp hơn có ý nghĩa ($P < 0,05$) so với vaccin tiêu chuẩn (3PD₅₀). Tuy nhiên sau khi tiêm mũi 1, kết quả đánh giá đáp ứng tạo kháng thể ở heo sau cai sữa của 2 loại vaccin LMLM 6PD₅₀ và 3PD₅₀ đã cho thấy rằng cả 2 loại vaccin 6PD₅₀ và 3PD₅₀ đều không tạo được miễn dịch bảo hộ đạt yêu cầu theo quy định khi tỷ lệ dương tính kháng thể đặc hiệu với virus LMLM chỉ ở mức 32,5% và 40,0%; tương ứng với vaccin 6PD₅₀ và 3PD₅₀. Kháng thể của heo mẹ ở mức cao có thể đã ảnh hưởng đến hiệu quả đáp ứng miễn dịch ở lần tiêm vaccin mũi thứ nhất. Cả 2 loại vaccin chỉ tạo được miễn dịch bảo hộ ở mức trên 70% sau khi tiêm mũi 2, cách 4 tuần sau khi tiêm mũi 1, với tỷ lệ 92% ở heo con được tiêm vaccin 6PD₅₀ và 75% ở heo con được tiêm vaccin 3PD₅₀.

Từ khoá: Chỉ số Ct, virus LMLM, hàm lượng kháng nguyên, vaccin, đáp ứng miễn dịch.

Immune response in weaning pigs after vaccination with two kinds of food and mouth disease vaccine: 6PD₅₀ and 3PD₅₀

Nguyen Ngoc Hai, Vo Thi Kieu Oanh

SUMMARY

FMD vaccines are classified into: Standard potency FMD vaccine (3PD₅₀) and high immune response vaccine (6PD₅₀). The high immune response vaccine (6PD₅₀) can improve the protective effect against other FMD virus strains with different topotypes. Realtime RT-PCR technique is the standard technique, commonly used in testing and diagnosing FMD. Based on the quantitative principle of realtime RT-PCR technique, the study analyzed the Ct index of realtime RT-PCR testing results for two popular commercial FMD vaccines at present in Viet Nam, such as: 6PD₅₀ and 3PD₅₀ vaccines. The 6PD₅₀ vaccine had a significantly ($P < 0.05$) lower Ct index compared to that of the 3PD₅₀ vaccine. However, after the first vaccine injection with either 6PD₅₀ or 3PD₅₀ FMD vaccine for the post weaning piglets, a very low percentage of pigs (32.5% and 40.0%) induced specific antibodies against FMD virus for both 6PD₅₀ and 3PD₅₀ FMD vaccines, respectively. A high maternal antibody could interfere to the efficacy of immune response after the first FMD vaccine injection for the post-weaning piglets. Both vaccines only induced immune response in pigs for protecting at a level of more than 70% after second vaccine injection in 4 weeks interval between the first and second vaccine injection, with 92% of piglets were injected with 6PD₅₀ vaccine and 75% of piglets were injected with 3PD₅₀ vaccine.

Keywords: Ct index, FMD virus, antigen content, vaccine, immune response.

¹. Bộ môn Bệnh truyền nhiễm và Thú y cộng đồng, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

². Chi cục Thú y tỉnh Long An

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Lở mồm long móng (LMLM) trên gia súc là một trong những bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, bắt buộc phải khai báo tại Việt Nam. Việc kiểm soát bệnh LMLM ở Việt Nam chủ yếu dựa vào việc tiêm phòng vaccin. Trên thực tế, Việt Nam đã kiểm soát tốt bệnh LMLM nhờ vào việc tiêm phòng đại trà với các vaccin có chất lượng tốt. Tuy nhiên từ năm 2018, nhiều trại heo vẫn xảy ra bệnh LMLM mặc dù đã áp dụng tiêm phòng bệnh LMLM một cách chặt chẽ. Ngoài sự khác biệt về kiểu di truyền giữa chủng virus LMLM vaccin và thực địa (Nguyen *et al.*, 2020) có thể ảnh hưởng đến hiệu quả bảo hộ của vaccin, hàm lượng kháng nguyên virus cũng là yếu tố quan trọng liên quan đến hiệu quả đáp ứng miễn dịch của vaccin (Brehm, 2008; Galdo Novo *et al.*, 2018).

Theo OIE (2021), dựa theo tiêu chuẩn đáp ứng miễn dịch và hiệu quả tiêm phòng (potency vaccin), vaccin LMLM có thể được chia thành 2 loại: vaccin tiêu chuẩn (standard potency vaccin) và vaccin có đáp ứng cao (higher potency vaccin). Vaccin tiêu chuẩn chứa hàm lượng kháng nguyên gấp 3 lần ($3PD_{50}$) so với liều có thể tạo được miễn dịch bảo hộ tối thiểu 50% heo được tiêm vaccin và công độc (PD_{50} - 50% protective dose), và vaccin có đáp ứng cao có hàm lượng kháng nguyên virus LMLM gấp đôi so với vaccin tiêu chuẩn ($6PD_{50}$). Vaccin tiêu chuẩn chỉ tạo đáp ứng miễn dịch hẹp với một số ít chủng virus LMLM thực địa và thời gian bảo hộ ngắn, được sử dụng phổ biến cho việc tiêm phòng bệnh LMLM ở các khu vực không có áp lực dịch bệnh cao. Vaccin LMLM có đáp ứng cao có thể tạo được miễn dịch nhanh và rộng đối với các biến chủng thực địa cùng kiểu kháng nguyên (topotype), miễn dịch kéo dài chỉ với sau khi tiêm 1 mũi vaccin, nên được khuyến cáo sử dụng trong các trường hợp tiêm phòng trong các khu vực có dịch hoặc tiêm phòng khẩn cấp nhằm ngăn chặn dịch LMLM bùng phát (OIE, 2021).

Vaccin LMLM thương mại tại Việt Nam có cả vaccin tiêu chuẩn ($3PD_{50}$) và vaccin có đáp ứng cao ($6PD_{50}$) như phân loại của OIE (2021).

Kỹ thuật realtime RT-PCR được sử dụng trong xét nghiệm chẩn đoán bệnh LMLM với giá trị chu kỳ ngưỡng Ct dương tính với virus LMLM là ≤ 35 (TCVN, 2019). Nghiên cứu phân tích hàm lượng RNA virus LMLM thông qua chỉ số Ct của kỹ thuật realtime RT-PCR trong 2 loại vaccin LMLM có giá trị PD khác nhau ($3PD_{50}$ và $6PD_{50}$) sẽ có thêm cơ sở khoa học tham khảo để đánh giá chất lượng của vaccin trên thị trường, cung cấp thông tin hữu ích cho các nhà chăn nuôi trong giải pháp vaccin phòng bệnh LMLM, hạn chế nguy cơ sử dụng vaccin kém chất lượng do quá trình bảo quản hoặc làm giả. Tuy nhiên, để đánh giá hiệu quả miễn dịch của các loại vaccin, không chỉ dựa trên hàm lượng kháng nguyên có trong vaccin mà phải dựa trên đáp ứng miễn dịch thực tế qua hiệu giá kháng thể, tỷ lệ vật nuôi đạt miễn dịch bảo hộ sau tiêm vaccin.

Tại Việt Nam, cho đến nay, vẫn chưa có các công bố liên quan đến đánh giá hàm lượng RNA kháng nguyên 2 loại vaccin LMLM tiêu chuẩn ($3PD_{50}$) và có đáp ứng cao ($6PD_{50}$), cũng như hiệu quả đáp ứng miễn dịch sau tiêm 2 loại vaccin này trên heo. Kết quả của nghiên cứu sẽ là cơ sở khoa học cho những đánh giá tiếp tục và đầy đủ hơn việc ứng dụng kỹ thuật realtime RT-PCR trong kiểm soát chất lượng vaccin LMLM, góp phần nâng cao hiệu quả phòng chống bệnh LMLM trên đàn vật nuôi.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

- Kit GeneJET Viral DNA, RNA Purification (Thermo, Mỹ) ly trích RNA của mẫu.

- Kit Master mix Invitrogen Superscript III qRT-PCR sử dụng cho realtime RT-PCR phát hiện RNA của virus LMLM.

- Kit ELISA (Liquid phase blocking) của phòng thí nghiệm Pirbright, Anh Quốc xét nghiệm kháng thể đặc hiệu với virus LMLM trong huyết thanh.

- Mẫu vaccin: Dựa trên thực tế sử dụng vaccin LMLM trên heo tại Việt Nam, đề tài thu

thập ngẫu nhiên mẫu của 2 loại vaccin LMLM thương mại từ các trại, đại lý và địa phương khác nhau. Tổng cộng 15 lọ mẫu vaccin gồm: 5 mẫu vaccin Aftopor (Merial) và 10 mẫu vaccin Aftogen Oleo (Biogenesis Bago) (bảng 1) được thu thập để thực hiện xét nghiệm so sánh hàm lượng RNA kháng nguyên LMLM bằng kỹ thuật realtime RT-PCR.

Vaccin Aftogen của Công ty Biogenesis Bago (Argentina): Mỗi một liều 2 ml chứa ít

nhất $6PD_{50}$ FMDV dòng O1-Campos bất hoạt. Chất bổ trợ là dầu khoáng với chất nhũ hóa có chứa Thimerosal 0,001%.

Vaccin Aftopor của Công ty Merial (Pháp, Anh), kháng nguyên của virus LMLM có chứa trong vaccin là O-Manisa và O-3039. Mỗi liều tiêm 2 ml chứa ít nhất lượng kháng nguyên tương đương $3PD_{50}$. Chất bổ trợ là nhũ dầu kép (DOE).

Bảng 1. Các mẫu vaccin LMLM được thu thập

STT	Loại vaccin	Địa điểm	Thời điểm thu thập
1	Aftogen ($6PD_{50}$)	Bình Phước	2019
2		Bình Phước	2019
3		Đồng Nai	2019
4		Bình Dương	2019
5		Bình Dương	2019
6		Tp. Hồ Chí Minh	2022
7		Tp. Hồ Chí Minh	2022
8		Tp. Hồ Chí Minh	2022
9		Tp. Hồ Chí Minh	2022
10		Tp. Hồ Chí Minh	2022
1	Aftopor ($3PD_{50}$)	Long An	2019
2		Long An	2019
3		Bình Dương	2019
4		Bình Dương	2019
5		Đồng Nai	2019

2.2. Nội dung nghiên cứu

- So sánh hàm lượng RNA kháng nguyên LMLM có trong vaccin thông qua chỉ số Ct của phản ứng realtime RT-PCR.

- Đánh giá đáp ứng miễn dịch sau tiêm 2 loại vaccin LMLM $3PD_{50}$ và $6PD_{50}$.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. So sánh hàm lượng RNA kháng nguyên LMLM có trong vaccin thông qua chỉ số Ct của phản ứng realtime RT-PCR

Virus LMLM có bộ gen là RNA sợi đơn dương, vì vậy mỗi sợi RNA được xem tương ứng

với 1 hạt virus LMLM. Quy trình xét nghiệm RNA kháng nguyên LMLM trong vaccin gồm 2 giai đoạn: (1) ly trích RNA kháng nguyên LMLM trong vaccin được thực hiện tại Bộ môn Bệnh truyền nhiễm và thú y cộng đồng, Khoa Chăn nuôi – Thú y, Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh; (2) Chạy phản ứng realtime RT-PCR phát hiện RNA kháng nguyên LMLM được thực hiện tại Chi cục Thú y vùng VI.

- Thu nhận RNA kháng nguyên LMLM trong vaccin: Thực hiện ly trích RNA kháng nguyên LMLM trong vaccin theo 2 bước: (1) tách kháng nguyên LMLM khỏi chất bổ trợ nhũ dầu;

(2) Ly trích RNA kháng nguyên LMLM vaccin thu được bằng bộ kit GeneJET Viral DNA, RNA Purification (Thermo, Mỹ).

Quy trình ly trích RNA kháng nguyên LMLM khỏi chất bổ trợ nhũ dầu: Lọ vaccin được để ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút, làm đồng nhất chất chứa trong lọ vaccin trên máy vortex trong 3 phút. Lấy một ml chất chứa trong lọ vaccin đã được đồng nhất hoà chung với 1 ml chloroform cho vào ống eppendorff 2ml, đồng nhất 2 thành phần trên máy vortex trong 1 phút. Sau đó ly tâm dịch đồng nhất ở tốc độ 4.000 vòng/phút, trong 15 phút. Thu lấy phần dịch trong bên trên và ly tâm ở tốc độ 4.000 vòng/phút, trong 15 phút. Thu lấy phần dịch trong này để ly trích RNA kháng nguyên LMLM dùng cho xét nghiệm realtime RT-PCR (P. Saravanan *et al.*, 2020, có điều chỉnh).

- Quy trình realtime RT-PCR phát hiện RNA của virus LMLM trong mẫu đã ly trích từ vaccin được thực hiện tại Chi cục Thú y vùng VI với các cặp mồi

(1) Phát hiện RNA của virus LMLM dựa trên vùng 5'UTR (untranslated region) với mồi xuôi FMDV_SA-IR-219-246F CAC YTY AAG RTG ACA YTG RTA CTGGTA C, mồi ngược FMDV_SA-IR-315-293RCAG ATY CCR AGT GWC ICI TGT TA và đoạn dò FMDV_SAMulti2-P-IR-292-269R FAM-CCT CGG GGT ACC TGA AGG GCA TCC-BHQ1

(2) Phát hiện RNA của virus LMLM dựa trên vùng FMDV RNA polymerase (3D) với mồi xuôi FMDV_Callahan 3DF ACT GGG TTT TAC AAA CCT GTG A, mồi ngược FMDV_Callahan 3DR GCG AGT CCT GCC ACGGA và đoạn dò FMDV_Callahan 3DP FAM-TCC TTT GCA CGC CGT GGG AC-BHQ1. Tất cả 2 cặp mồi và 2 đoạn dò được cho cùng vào chung một phản ứng realtime RT-PCR. Phản ứng realtime RT-PCR được thực hiện với chương trình luân nhiệt như sau: 50°C trong thời gian 15 phút, tiếp theo là 95°C trong thời gian 2 phút, sau đó là 40 chu kỳ luân nhiệt ở nhiệt độ 95°C trong 20 giây và 60°C trong 40 giây.

2.3.2. Đánh giá đáp ứng miễn dịch sau tiêm 2 loại vaccin Aftopor (3PD₅₀) và vaccin Aftogen (6PD₅₀) trên heo sau cai sữa

- Chuẩn bị heo thí nghiệm

Thí nghiệm sử dụng 40 heo sau cai sữa lúc 5 - 7 tuần tuổi, từ các heo nái của cùng một trại, đã tiêm phòng vaccin LMLM 1 tháng trước khi sinh, với quy trình tiêm phòng giống nhau. Ở thời điểm 1 tuần trước khi chia lô bố trí thí nghiệm, heo được lấy mẫu kiểm tra định lượng kháng thể mẹ truyền để có cơ sở phân lô heo thí nghiệm, đảm bảo sự đồng đều kháng thể mẹ truyền ở 2 lô thí nghiệm. Một tuần sau khi lấy mẫu kiểm tra kháng thể mẹ truyền, trên cơ sở kết quả xét nghiệm, chia heo thành 2 lô thí nghiệm, mỗi lô gồm 20 heo, đồng đều về hiệu giá kháng thể, trọng lượng, thể trạng, giới tính (lúc 6 - 8 tuần tuổi). Thí nghiệm được lặp lại 2 lần, tổng số heo sau cai sữa được sử dụng cho thí nghiệm là 80 con.

Heo thí nghiệm được chăm sóc nuôi dưỡng, chủng các loại vaccin phòng các bệnh khác như nhau theo quy trình của Trung tâm Giống vật nuôi tỉnh Long An.

- Phân lô thí nghiệm và gây miễn dịch

Heo thí nghiệm được chia thành 2 lô, mỗi lô gồm 20 heo. Lô 1 tiêm vaccin Aftopor (3PD₅₀) và lô 2 tiêm vaccin Aftogen (6PD₅₀).

Quy trình tiêm vaccin: vaccin được tiêm với liều 2 ml/ con, tiêm 2 mũi cách nhau 4 tuần. Mũi tiêm vaccin thứ nhất được thực hiện lúc heo 6 - 8 tuần tuổi và mũi thứ hai được thực hiện lúc heo 10 - 12 tuần tuổi.

- Lấy mẫu xét nghiệm kháng thể

Mẫu máu đông được lấy từ xoang tĩnh mạch cổ ở heo. Ống tiêm chứa máu được đặt nằm nghiêng và để máu đông tự nhiên, chiết tách huyết thanh, bảo quản ở 2 - 8°C và gửi mẫu thực hiện xét nghiệm tại Trung tâm Chẩn đoán xét nghiệm bệnh động vật thuộc Chi cục Thú y vùng VI, thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu xét nghiệm kháng thể được

lấy tại 3 thời điểm: trước khi heo được tiêm vaccin (5 – 7 tuần tuổi), 4 tuần sau tiêm mũi 1 vaccin, và 4 tuần sau tiêm mũi 2 vaccin.

Xét nghiệm kháng thể đặc hiệu với virus LMLM bằng kỹ thuật ELISA pha lỏng (Liquid phase blocking ELISA) với bộ kit của phòng thí nghiệm Pirbright, Anh Quốc.

Thực hiện phân lô, số lượng heo bố trí thí nghiệm, thời điểm tiêm vaccin, lấy mẫu, số lượng mẫu cụ thể được trình bày theo bảng 2.

Chỉ tiêu theo dõi và cách đánh giá kết quả: Chỉ số Ct của từng lọ mẫu vaccin và chỉ số Ct trung bình của từng loại vaccin, tỷ lệ heo có kháng thể LMLM theo xét nghiệm ELISA.

Bảng 2. Bố trí thí nghiệm kiểm tra hiệu quả của 2 loại vaccin Aftogen và Aftopor

Lô	Thời điểm tiêm vaccin		Thời điểm lấy mẫu xét nghiệm			Số lượng mẫu xét nghiệm		
	Mũi 1	Mũi 2	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3
Aftogen (6PD ₅₀) n = 20/ đợt	6 - 8 tuần tuổi	10-12 tuần tuổi (4 tuần sau mũi 1)	Trước tiêm phòng 1 tuần (5 - 7 tuần tuổi)	4 tuần sau tiêm phòng mũi 1	4 tuần sau tiêm phòng mũi 2	20	20	20
Aftopor (3PD ₅₀) n = 20/ đợt						20	20	20
Tổng 1 đợt						40	40	40
Tổng 2 đợt						80	80	80

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. So sánh hàm lượng RNA kháng nguyên LMLM có trong vaccin thông qua chỉ số Ct của phản ứng realtime RT-PCR

Kết quả xét nghiệm realtime RT-PCR cho thấy tất cả 15 lọ mẫu vaccin đều dương tính với RNA virus LMLM. Giá trị Ct của các lọ mẫu vaccin được trình bày trong bảng 3. Qua bảng 3, chỉ số Ct của tất cả các lọ mẫu vaccin đều ở mức rất thấp so với giá trị chu kỳ ngưỡng Ct dương tính với virus LMLM theo TCVN (2019) là ≤ 35 . Hay nói khác hơn, hàm lượng RNA kháng nguyên LMLM trong các lọ mẫu vaccin đều rất cao. Tuy nhiên, kết quả cũng ghi nhận sự không đồng đều về chỉ số Ct giữa các lọ của cùng loại vaccin.

Cũng theo kết quả ở bảng 3, đối với vaccin Aftogen, giá trị Ct của các lọ mẫu vaccin khác biệt nhau khá lớn. Lọ mẫu số 5 có nguồn gốc từ Bình Dương có giá trị Ct thấp nhất là 8,95 và cao nhất là 14,30 của lọ mẫu vaccin có nguồn gốc từ Đồng Nai. Hai lọ mẫu vaccin có nguồn

gốc từ Bình Phước có chỉ số Ct gần như bằng nhau (10,61 và 10,69). Lọ mẫu vaccin còn lại, tuy cũng có nguồn gốc từ Bình Dương như lọ mẫu số 5, nhưng chỉ số Ct lại cao hơn khá nhiều so với chỉ số Ct của lọ mẫu số 5: 11,62 so với 8,95. Các lọ mẫu vaccin Aftogen thu thập ở Tp. Hồ Chí Minh năm 2022 có chỉ số Ct khá đồng đều, dao động từ 12,24 đến 13,51.

Tương tự, với vaccin Aftopor các chỉ số Ct của các lọ mẫu vaccin cũng không đều nhau. Chênh lệch giá trị Ct thấp nhất và cao nhất giữa các lọ mẫu vaccin khá lớn và ở mức 4,74 chu kỳ. Lọ mẫu số 2 có giá trị Ct thấp nhất là 11,07 có nguồn gốc từ Long An và lọ mẫu số 5 có giá trị Ct cao nhất (15,81) có nguồn gốc từ Đồng Nai. Hai lọ mẫu vaccin 3 và 4 có nguồn gốc từ Bình Dương có giá trị Ct tương đương nhau, tương ứng là 14,94 và 14,85. Tuy cùng một khu vực lấy mẫu, 2 lọ mẫu vaccin Aftopor thuộc tỉnh Long An lại có giá trị Ct chênh lệch nhau khá lớn (11,07 so với 13,30). Theo nguyên tắc định lượng của realtime-PCR, những mẫu có hàm lượng RNA càng cao sẽ có giá trị Ct càng

thấp và ngược lại (Qiagen, 2014). Kết quả Ct của các lọ mẫu vaccin LMLM trong nghiên cứu (bảng 3) cho thấy có sự khác biệt nhất định về giá trị Ct, hay hàm lượng RNA kháng nguyên LMLM giữa các lọ vaccin và giữa các địa điểm vaccin được thương mại, và điều này có thể ảnh hưởng đến đáp ứng miễn dịch trên đàn heo được tiêm vaccin.

Nguyên nhân của sự chênh lệch này có thể là do việc bảo quản vaccin không đúng tiêu chuẩn kỹ thuật, làm ảnh hưởng đến hàm lượng RNA kháng nguyên LMLM trong từng mẫu vaccin. Khuyến cáo của OIE (2021) ghi rõ vaccin LMLM rất nhạy cảm với nhiệt độ, hàm lượng hạt virus LMLM trong vaccin có thể bị sụt giảm nếu điều kiện bảo quản không đạt

theo yêu cầu và sẽ ảnh hưởng đến chất lượng của vaccin. Vaccin LMLM cần được bảo quản ổn định ở nhiệt độ 2 – 8°C trong suốt thời gian lưu trữ, vận chuyển đến nơi tiêm phòng. Theo El-Sayed *et al.* (2012), vaccin LMLM được bảo quản ở 4°C trong vòng 21 tháng vẫn tạo được hiệu quả bảo hộ 100%, nhưng chỉ duy trì được trong 2 tuần nếu bảo quản ở 25°C, và 1 tuần ở 37°C. Vaccin sẽ không có hiệu quả bảo hộ nếu vaccin được bảo quản ở 4°C sau 27 tháng, ở 25°C sau 4 tuần và ở 37°C sau 3 tuần. Sự chênh lệch hàm lượng RNA kháng nguyên LMLM trong từng lọ vaccin có thể là yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả đáp ứng miễn dịch trên đàn heo được tiêm vaccin giữa các trại và các khu vực.

Bảng 3. Giá trị Ct kết quả realtime RT-PCR RNA kháng nguyên LMLM trong vaccin

Ký hiệu mẫu	Vaccin	Địa điểm	Giá trị Ct	Trung bình Ct
1	Aftogen (6PD ₅₀)	Bình Phước	10,61	12,068 ^b ± 1,612
2		Bình Phước	10,69	
3		Đồng Nai	14,30	
4		Bình Dương	11,62	
5		Bình Dương	8,95	
6		Tp. Hồ Chí Minh	12,63	
7		Tp. Hồ Chí Minh	12,92	
8		Tp. Hồ Chí Minh	13,21	
9		Tp. Hồ Chí Minh	13,51	
10		Tp. Hồ Chí Minh	12,24	
1	Aftopor (3PD ₅₀)	Long An	13,30	14,121 ^a ± 1,628
2		Long An	11,07	
3		Bình Dương	14,94	
4		Bình Dương	14,85	
5		Đồng Nai	15,81	

Ghi chú: a, b trong cùng 1 cột cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$

Hơn nữa, kết quả trong bảng 3 cũng cho thấy, vaccin Aftogen có giá trị Ct trung bình là 12,068 thấp hơn nhiều so với giá trị Ct trung bình của vaccin Aftopor (14,121) và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$. Nếu căn cứ theo nguyên tắc bán định

lượng RNA trong kỹ thuật realtime RT-PCR (Qiagen, 2014) và nguyên tắc 1 sợi RNA tương ứng 1 hạt virus LMLM, sự khác biệt nhất định về hàm lượng RNA kháng nguyên LMLM giữa 2 loại vaccin thương mại trong nghiên cứu.

Huang *et al.* (2009) dựa trên giá trị Ct của phản ứng realtime RT-PCR và nồng độ RNA virus LMLM đã thiết lập đường chuẩn cho phép xác định được lượng hạt virus tương ứng có trong mẫu theo chuỗi nồng độ RNA virus từ 10^1 - 10^9 copy. Armson *et al.* (2018) đã sử dụng kỹ thuật realtime RT-PCR để định lượng hạt virus LMLM trong mẫu và kết luận giá trị Ct càng thấp thì hàm lượng hạt virus LMLM trong mẫu càng cao.

Tuy nhiên, việc đánh giá hiệu quả đáp ứng miễn dịch của vaccin cần phải dựa trên việc xét nghiệm kháng thể, xác định tỷ lệ bảo hộ của vaccin với tác nhân gây bệnh.

3.2. Đánh giá đáp ứng miễn dịch sau tiêm 2 loại vaccin LMLM 3PD₅₀ và 6PD₅₀

Hàm lượng kháng nguyên trong vaccin LMLM được biết là có ảnh hưởng quan trọng đến hiệu quả của vaccin sau khi tiêm phòng. Theo OIE (2021), khuyến nghị các

công thức vaccin tiêu chuẩn (3PD₅₀) được sử dụng để tiêm phòng định kỳ, và nên dùng vaccin có đáp ứng cao (6PD₅₀) trong trường hợp tiêm phòng tại các khu vực có dịch hoặc tiêm phòng khẩn cấp. Để làm rõ hơn giá trị đáp ứng tạo miễn dịch của 2 loại vaccin LMLM 3PD₅₀ và 6PD₅₀, cần xác định hiệu quả miễn dịch sau tiêm của 2 loại vaccin này trên heo.

3.2.1. Xác định hiệu giá kháng thể mẹ truyền trước khi tiêm vaccin

Tuổi, trọng lượng heo và kháng thể mẹ truyền sẽ ảnh hưởng đến hiệu quả đáp ứng miễn dịch sau tiêm vaccin, vì vậy để đảm bảo tác động của kháng thể mẹ truyền đồng đều, tất cả heo được đưa vào bố trí thí nghiệm đã được lấy máu xét nghiệm kháng thể mẹ truyền và sau đó phân bố đồng đều theo tuổi, trọng lượng và hiệu giá kháng thể ở mỗi lô được tiêm vaccin Aftopor hoặc Aftogen (bảng 4, 5).

Bảng 4. Tuổi mẫu và trọng lượng heo con trong các lô thí nghiệm

Đặc tính	Lô Aftogen (n=40)	Lô Aftopor (n=40)	p
	X ± SD	X ± SD	
Tuổi heo (ngày)	39,43± 5,55	39,8±5,27	0,7576
Trọng lượng (kg)	11,99± 1,72	11,44± 2,37	0,2381

Bảng 5. Kết quả xét nghiệm kháng thể ở heo con trước tiêm vaccin bằng kỹ thuật ELISA pha lỏng

Kết quả	Lô Aftogen		Lô Aftopor		P
	Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)	
Âm	13	33	10	25	0,459
Dương	27	68	30	75	
Tổng	40	100	40	100	
HGKT trung bình ± SD	223,83 ± 223,88		228,90 ± 228,38		0,9047

Kết quả của bảng 4 và bảng 5 cho thấy không có sự khác biệt về tuổi, trọng lượng, đặc biệt là tỷ lệ dương tính và hiệu giá kháng thể mẹ truyền đặc hiệu với virus LMLM ở heo của 2 lô được tiêm vaccin Aftopor và Aftogen trong nghiên

cứu. Và như vậy có nghĩa là, sự ảnh hưởng của các yếu tố nói trên, nhất là kháng thể mẹ truyền đối với hiệu quả đáp ứng miễn dịch của 2 loại vaccin LMLM trong thí nghiệm về cơ bản không có khác biệt giữa 2 lô thí nghiệm.

3.2.2. Đánh giá hiệu quả đáp ứng miễn dịch sau khi tiêm vaccin

Tất cả heo ở 2 lô đều được tiêm 2 mũi vaccin LMLM, vaccin Aftopor ($3PD_{50}$) hoặc Aftogen ($6PD_{50}$) cách nhau 4 tuần và được lấy mẫu xét

NGHIỆM cùng thời điểm, 2 lần sau tiêm vaccin để xác định tỷ lệ bảo hộ với virus LMLM bằng xét nghiệm ELISA pha lỏng (Pirbright, Anh Quốc). Kết quả xét nghiệm được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6. Tỷ lệ heo có kháng thể LMLM dương tính sau tiêm phòng vaccin

	Lô Aftogen			Lô Aftopor		P
	Kết quả	Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)	
Tiêm phòng mũi 1	Âm tính	27	67,5	24	60,0	0,485
	Dương tính	13	32,5	16	40,0	
	Tổng	40	100	40	100	
	Lô Aftogen			Lô Aftopor		P
	Kết quả	Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)	
Tiêm phòng mũi 2	Âm tính	3	8	9	25,0	0,052
	Dương tính	34	92,0	27	75,0	
	Tổng	37	100	36	100	

Dựa trên kết quả xác định tỷ lệ heo có kháng thể đối với virus LMLM, bằng kỹ thuật ELISA pha lỏng của Pirbright, trên heo sau khi tiêm phòng vaccin ở hai lô thí nghiệm Aftogen và Aftopor (bảng 6), có thể nhận xét như sau: Sau tiêm phòng mũi 1, tỷ lệ heo dương tính kháng thể với virus LMLM ở lô thí nghiệm vaccin Aftogen và Aftopor đều ở mức rất thấp; lần lượt là 32,5% và 40%; và đều thấp hơn so với tỷ lệ quy định giám sát sau tiêm phòng theo Thông tư 07/2016/TT-BNNPTNT (ít nhất 70% vật nuôi được tiêm vaccin LMLM dương tính với kháng thể). Tỷ lệ dương tính kháng thể giữa 2 lô không có sự khác biệt thống kê với $P > 0,05$. Điều này cho thấy hiệu quả miễn dịch của vaccin không chỉ bị chi phối bởi hàm lượng kháng nguyên (hạt virus, vi khuẩn, protein) trong vaccin, mà có thể còn bởi bản chất kháng nguyên, chất bổ trợ có trong vaccin (Khorasani *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2022). Theo Khorasani *et al.* (2016), với cùng lượng kháng nguyên LMLM như nhau, vaccin LMLM có chất bổ trợ khác nhau tạo nên hiệu quả đáp ứng miễn dịch, và giá trị PD_{50} khác nhau. Điều này cũng cần

phải tiếp tục được nghiên cứu để làm rõ.

Tuy nhiên, sau khi tiêm mũi 2 (cách 4 tuần sau tiêm mũi 1), tỷ lệ mẫu dương tính kháng thể với virus LMLM ở lô tiêm vaccin Aftogen ($6PD_{50}$) tăng cao rõ rệt (92%, 34/37), cao hơn hẳn so với lô tiêm vaccin Aftopor ($3PD_{50}$) (75%, 27/36), với $P = 0,052$ (bảng 6). Sau khi tiêm mũi 2, cả 2 vaccin Aftogen ($6PD_{50}$) hoặc Aftopor ($3PD_{50}$) mới đạt được tỷ lệ dương tính ở mức trên 70% theo quy định. Kết quả cho thấy, có thể hiệu quả tiêm phòng vaccin LMLM ở cả 2 lô đã bị ảnh hưởng bởi kháng thể mẹ truyền, khiến đáp ứng miễn dịch sau tiêm vaccin không cao. Và như vậy, có lẽ cần có nghiên cứu thực địa đánh giá mức hiệu giá kháng thể đặc hiệu với virus LMLM mẹ truyền để xác định tuổi tiêm phòng lần đầu vaccin LMLM phù hợp cho đàn heo.

Kết quả thu được trong bảng 6 cho thấy sau khi tiêm mũi 2, vaccin có đáp ứng cao Aftogen ($6PD_{50}$) có tỷ lệ dương tính kháng thể với virus LMLM, tăng cao hơn nhiều (92%) so với 75% của vaccin Aftopor ($3PD_{50}$), và đã tiệm cận với khác biệt thống kê với $P = 0,052$.

Theo Ochsenbein *et al.* (2000), miễn dịch nhớ phụ thuộc vào liều và thời gian tồn tại của kháng nguyên. Sự gia tăng mạnh tỷ lệ dương tính kháng thể ở heo sau tiêm mũi 2 vaccin LMLM có đáp ứng cao Aftogen (6PD₅₀) có thể là do hàm lượng kháng nguyên trong vaccin ở mức cao hơn nhiều so với vaccin 3PD₅₀ đã tạo được nhiều tế bào miễn dịch nhớ hơn, nhờ đó heo được tiêm vaccin LMLM Aftogen (6PD₅₀) đã tạo được miễn dịch mạnh hơn sau khi tiêm vaccin mũi 2.

Nghiên cứu của Jamal *et al.* (2008) về đáp ứng miễn dịch khi tiêm vaccin LMLM trên bò cũng cho thấy bò được tiêm vaccin LMLM 3PD₅₀ chỉ có 71% đạt miễn dịch, trong khi tỷ lệ này ở bò được tiêm vaccin 6PD₅₀ là 81%. So với tỷ lệ đạt mức quy định tối thiểu là 70%, vaccin có đáp ứng cao Aftogen (6PD₅₀) đạt tỷ lệ vượt trội với nhiều hơn 22% và gần mức đạt tỷ lệ dương tính toàn đàn. Kết quả này cũng phù hợp với khuyến cáo của OIE (2021) về việc sử dụng vaccin LMLM có đáp ứng cao 6PD₅₀ tại các khu vực có nguy cơ dịch bệnh cao. Theo Çokçalışkan *et al.* (2017), vaccin LMLM 6PD₅₀ tạo đáp ứng miễn dịch cao hơn hẳn so với vaccin 3PD₅₀ ($P < 0,05$). Ngoài ra, vaccin 6PD₅₀ còn có ưu thế là đáp ứng miễn dịch sau tiêm vaccin ở vật nuôi không bị ảnh hưởng bởi kháng thể mẹ truyền. Và tại Thổ Nhĩ Kỳ, để gia tăng hiệu quả kiểm soát bệnh LMLM trên đàn gia súc, vaccin LMLM 3PD₅₀ đã được thay thế bằng vaccin 6PD₅₀ (Çokçalışkan *et al.*, 2017). Hơn nữa, vaccin LMLM 6PD₅₀ còn có thể khắc phục sự tương đồng kháng nguyên thấp giữa chủng virus vaccin và thực địa, giúp gia tăng hiệu quả bảo hộ đối với bệnh LMLM ở vật nuôi trong điều kiện có sự lưu hành và biến đổi của virus LMLM (Brehm *et al.*, 2008). Dựa trên tình hình thực tế mức độ nguy hiểm của bệnh LMLM, Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ và Ủy ban Giám sát sức khỏe cây trồng và vật nuôi của Mỹ cũng chọn vaccin LMLM 6PD₅₀ cho chiến lược kiểm soát bệnh LMLM tại Mỹ (USDA, 2020).

IV. KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu cho thấy việc đánh giá hàm lượng RNA kháng nguyên LMLM dựa trên chỉ số Ct của xét nghiệm realtime RT-PCR có ý nghĩa thực tiễn trong việc sử dụng vaccin LMLM.

Hiệu quả tiêm phòng vaccin LMLM bị ảnh hưởng bởi kháng thể mẹ truyền. Cần có nghiên cứu thực địa đánh giá mức hiệu giá kháng thể đặc hiệu với virus LMLM mẹ truyền để xác định tuổi tiêm phòng lần đầu vaccin LMLM phù hợp cho đàn heo.

Nhìn chung, vaccin có đáp ứng cao (higher potency vaccin, 6PD₅₀), hay vaccin tiêu chuẩn (standard potency vaccin, 3PD₅₀) đều có thể không đạt được tỷ lệ heo dương tính với kháng thể đặc hiệu với virus LMLM nếu chỉ tiêm 1 mũi ở thời điểm 6 – 8 tuần tuổi. Để đạt được tỷ lệ bảo hộ chắc chắn theo yêu cầu, trên 70% heo có kháng thể sau tiêm vaccin với virus LMLM, cần phải thực hiện quy trình tiêm 2 mũi vaccin, cách nhau 4 tuần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Armsona, Doela, V. M. C., Madia, M., Parida, S., Lemirec, K. A., Holderc, D. J., Dasc, A., McIntoshc, M. T., King, D. P., 2018. Detection of foot-and-mouth disease virus in milk samples by real-time reverse transcription polymerase chain reaction: Optimisation and evaluation of a high-throughput screening method with potential for disease surveillance Bryony. *Veterinary Microbiology* 223, 189–194.
2. Brehm, K.E., Kumar, N., Thulke, H. H., Haas, B., 2008. High potency vaccine induce protection against heterologous challenge with foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, Volume 26, Issue 13, Pages 1681-1687.
3. Ehab El-Sayed, Wael Mossad Gamal El-Din, Sonia Ahmed Rizk, Magdi Abd El-Aty, 2012. Effect of different storage temperatures on the efficacy of the bivalent foot and mouth disease

- oil vaccin. *Journal of Advanced Veterinary Research* Volume 2, 198-205.
4. Foot-and-Mouth Disease Vaccination Policy in the United States, USDA, October 2020.
 5. Galdo Novo, S., Malirat, V., Maradei, E.D., Pedemonte, A.R., Espinoza, A.M., Smitsaart, E., Lee, K.N., Park, J.H., Bergmann, I.E., 2018. Efficacy of a high quality O1/Campos foot-and-mouth disease vaccine upon challenge with a heterologous Korean O Mya98 lineage virus in pigs. *Vaccin*, 36 12: 1570-1576.
 6. Huang, X., Li, Y., Zheng, C. Y., 2009. A novel single-cell quantitative real-time RT-PCR method for quantifying foot-and-mouth disease viral RNA. *Journal of Virological Methods* 155, 150–156.
 7. Jamal SM, Bouma A, van den Broek J, Stegeman A, Chénard G, Dekker A., 2008. Foot-and-mouth disease vaccine potency testing: the influence of serotype, type of adjuvant, valency, fractionation method, and virus culture on the dose-response curve in cattle. *Vaccin*. 2008; 26:6317–6321.
 8. Nguyen Van Diep, Trinh Thi Bich Ngoc, Le Quoc Hoa, Bui Thi To Nga, BoKyo Kang, Jinsik Oh, Nguyen Thi Lan, Van Phan Le, 2020. O/SEA/Mya-98 lineage foot-and-mouth disease virus was responsible for an extensive epidemic that occurred in late 2018 in Vietnam. *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04763-8>.
 9. OIE 2021. Chapter 3.1.8. Foot and mouth disease in *OIE Manual of Diagnostic Tests and vaccine for Terrestrial Animals*, 2021.
 10. Qiagen, 2014. *QuantiFast® SYBR® Green PCR Handbook*.
 11. Tiêu chuẩn Việt Nam 8400-1:2019. Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán. Phần 1: Bệnh lở mồm long móng.
 12. Thông tư 07/2016/TT-BNNPTNT ngày 31/5/2016, Phụ lục 01: Danh mục bệnh động vật trên cạn phải công bố dịch; Danh mục bệnh truyền lây giữa động vật và người; Danh mục bệnh động vật cấm giết mổ, chữa bệnh.
 13. Çokçalışkan, C., Türkoğlu, T., Uzunlu, E., Sareyyüpoğlu, B., Hancı, İ., İpek, A., Arslan, A., Babak, A., İlideniz, G., & Gülyaz, V., 2017. Influence of vaccin potency and booster administration of foot-and-mouth disease vaccines on the antibody response in calves with maternal antibodies. *Journal of veterinary science*, 18S1, 315–322.
 14. Adrian F. Ochsenbein, Daniel D. Pinschewer, Sophie Sierro, Edit Horvath, Hans Hengartner, and Rolf M. Zinkernagel, 2000. Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *PNAS*, vol. 97, no. 24, 13263–13268.
 15. Stevenson HS, Wang Y, Muller R, Edelman DC, 2015. Long-term stability of total RNA in RNAsstable® as evaluated by expression microarray. *Biopreserv Biobank*. 2015 Apr;132:114-22. doi: 10.1089/bio.2014.0068.
 16. Fabre AL, Colotte M, Luis A, Tuffet S, Bonnet J., 2014. An efficient method for long-term room temperature storage of RNA. *Eur J Hum Genet*. 2014 Mar;223:379-85. doi: 10.1038/ejhg.2013.145.
 17. Saravanan P, Iqbal Z, Selvaraj DPR, ApRNAa M, Umapathi V, Krishnaswamy N, Tamilselvan RP, 2020. Comparison of chemical extraction methods for determination of 146S content in foot-and-mouth disease oil-adjuvanted vaccine. *J Appl Microbiol*. 2020 Jan;1281:65-73. doi: 10.1111/jam.14465.
- Ngày nhận 30-5-2022
 Ngày phản biện 21-6-2022
 Ngày đăng 1-11-2022