

Nghiên cứu khoa học

CHỌN CHỦNG VIRUS LỞ MỒM LONG MÓNG TYP O TỪ THỰC ĐỊA ĐỂ NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VACCIN TẠI VIỆT NAM

*Ngô Thanh Long¹, Nguyễn Thanh Phương¹, Võ Văn Hùng¹,
Bạch Đức Lưu¹, Nguyễn Văn Long², Nguyễn Thu Thủy², Phạm Văn Đông² và cs*

TÓM TẮT

Virus gây bệnh lở mồm long móng (LMLM) ở Việt Nam thu thập từ thực địa đã được nghiên cứu, chọn lọc để làm giống cho sản xuất vaccin phòng bệnh LMLM trên gia súc. Kết quả là chủng virus LMLM type O, RAHO6/FMD/O-135 đã được chọn để làm chủng giống từ 118 chủng virus thu thập trên trâu, bò và lợn mắc bệnh LMLM ở Việt Nam trong những năm 2008 - 2015. Kết quả phân tích kháng nguyên và phân tử của chủng này cho thấy mức tương đồng về các chỉ tiêu so sánh giữa chủng virus này và các chủng virus thực địa khác bao gồm toptype PanAsia, Ind2001d, Mya-98 và Cathay đạt tới 100% và đều có giá trị r_1 đạt $>0,3$. Chủng virus RAHO6/FMD/O-135 thích nghi và phát triển tốt ở môi trường tế bào BHK-21. Vaccin sản xuất từ chủng virus này thử nghiệm trên bò cho thấy 100% số bò thí nghiệm đều có hiệu giá kháng thể trung hòa bảo hộ đạt yêu cầu sau 21 ngày tiêm phòng. Như vậy chủng virus LMLM type O, RAHO6/FMD/O-135 đã đạt tiêu chuẩn chủng giống (master seed) để sản xuất vaccin phòng bệnh LMLM cho gia súc tại Việt Nam.

Từ khoá: LMLM, Chủng virus giống, Vaccin, Giá trị "r1", Việt Nam

Selection of foot and mouth virus strain, type O from the fields for vaccine development in Viet Nam

*Ngo Thanh Long, Nguyen Thanh Phuong, Vo Van Hung,
Bach Duc Luu, Nguyen Van Long, Nguyen Thu Thuy, Pham Van Dong et al.*

SUMMARY

A study on identifying and selecting foot-and-mouth virus (FMDV) strain from the fields throughout Viet Nam for development of vaccine against FMD disease in animals was conducted. As a result, one FMDV, serotype O RAHO6/FMD/O-135 strain was selected from 118 field FMDV strains collecting from the FMD infected buffaloes, cattle and pigs during 2008 and 2015 in Viet Nam. The result of antigenic and molecular analysis for FMDV RAHO6/FMD/O-135 indicated that similarity level on the comparison indexes between this virus strain and the other field FMDV strains, such as PanAsia, Ind2001d, Mya-98 and Cathay strains (that were circulated and caused FMD outbreaks in Viet Nam) reached 100% and the r_1 value was >0.3 . The RAHO6/FMD/O-135 virus strain developed and adapted well in the BHK-21 cell medium. Vaccine produced from the RAHO6/FMD/O-135 virus was tested on cattle. The testing result indicated that 100% of the vaccinated cattle were protected with high titer of antibody in 21 days after vaccination. The studied results also indicated that the FMDV (RAHO6/FMD/O-135) was met with the standards of master seed for production of vaccine against FMD disease in Viet Nam.

Keywords: FMDV, Master seed, Vaccine, "r1" value, Viet Nam

¹. Cơ quan Thú y vùng VI

². Cục Thú y

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh lở mồm long móng (LMLM) là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm trên trâu, bò, heo, cừu, dê và một số loài động vật hoang dã bởi khả năng lây lan nhanh, mạnh và gây thiệt hại nặng về kinh tế. Tại Việt Nam hiện nay, tiêm phòng vaccin cho gia súc là yêu cầu cấp bách nhằm giảm đến mức thấp nhất tổn thất kinh tế cho ngành chăn nuôi. Từ những năm 1900, các loại vaccin vô hoạt được sử dụng để kiểm soát dịch bệnh ở các quốc gia. Bệnh LMLM vẫn còn là một mối quan tâm lớn về kinh tế cho các nước có bệnh và là mối đe dọa ở những nước không có bệnh LMLM (Boklund, 2013). Virus LMLM thuộc họ *Picornaviridae*, chi *Aphthovirus*, đường kính 20-28nm, không vỏ bọc. Có 7 type virus với đặc tính kháng nguyên khác nhau bao gồm type O, A, C, Asia1, SAT1, SAT2 và SAT3 và có hơn 76 type phụ. Các type phụ này có kháng nguyên biến đổi gây ra vấn đề lớn trong kiểm soát bệnh LMLM như tạo nên tính độc lực gây bệnh hoặc tiêm phòng với một type phụ này thì không bảo vệ chống lại các type phụ khác và có thể không hoàn toàn bảo hộ với các phân nhóm khác trong cùng một type phụ virus. Do đó phát triển vaccin phòng bệnh từ chủng virus thực địa được nhiều nước trên thế giới áp dụng cho mỗi quốc gia đang có virus lưu hành để đảm bảo có sự tương đồng giữa virus vaccin và virus thực địa theo khuyến cáo của tổ chức Thú y thế giới OIE (Paton, 2005).

Ở Việt Nam, LMLM đã trở thành dịch địa phương với 3 type virus bao gồm type O, A, và Asia 1 đã được phát hiện. Hàng năm, dịch bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi trâu, bò, dê và lợn. Chính phủ Việt Nam rất quyết tâm trong công tác khống chế bệnh thông qua cam kết cung cấp ngân sách cho chương trình quốc gia phòng, chống bệnh LMLM. Vaccin sử dụng cho chương trình quốc gia phòng, chống bệnh LMLM được nhập khẩu từ nước ngoài, bao gồm vaccin một type O (kháng nguyên O1 Manisa + O3039) dùng cho lợn và vaccin chứa hai type, type O + type A (kháng nguyên A 22 Irq+A May97) dùng cho loài nhai lại. Cho đến nay, bệnh vẫn còn diễn biến rất phức tạp và có thể bùng phát dịch LMLM bất cứ lúc nào.

Theo các báo cáo của Cục Thú y về dịch bệnh LMLM trên gia súc từ năm 1997-2015, bệnh do virus type O, type A và type Asia 1, trong đó, virus LMLM type O vẫn chiếm ưu thế lưu hành so với type A và type Asia 1. Trong nghiên cứu này chúng tôi ưu tiên phân tích đặc điểm sinh học của virus type O để lựa chọn chủng virus có khả năng phát triển thành chủng virus vaccin từ các chủng thực địa được thu thập trong 8 năm gần đây (từ năm 2008-2015) dựa trên phân bố về yếu tố không gian, thời gian, sự biến chủng và cả đặc điểm sinh học của virus, để đảm bảo rằng virus được chọn để sản xuất vaccin có khả năng bảo hộ với các chủng virus LMLM type O đang lưu hành tại Việt Nam.

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

2.1 Nội dung nghiên cứu

- Chọn chủng virus LMLM từ thực địa
- Chuẩn độ virus và đánh giá sự thích nghi của virus trên tế bào BHK-21
- Tính giá trị r₁, xác định mức tương đồng kháng nguyên giữa virus vaccin và virus thực địa.

2.2 Vật liệu

- Chủng virus LMLM từ thực địa: Tổng số 154 mẫu đã được thu thập, định type tại Cơ quan Thú y vùng VI và kháng định tại Phòng thí nghiệm tham chiếu về bệnh LMLM của OIE.
- Virus chọn làm giống sản xuất vaccin thu thập từ 18 tỉnh đại diện 3 miền để nghiên cứu về tương đồng kháng nguyên và đặc điểm sinh học.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Chọn chủng virus LMLM từ thực địa

- Mẫu virus LMLM type O được thu thập từ các địa phương có dịch bệnh xảy ra trên phạm vi cả nước trong khoảng thời gian từ năm 1997 đến 2015. Tổng số 154 mẫu đã được thu thập, xác định type virus tại Cơ quan Thú y Vùng VI. Sau đó, các mẫu này được gửi đến Phòng thí nghiệm tham chiếu về bệnh LMLM của OIE (World Reference Laboratory, Pirbright - UK) để kháng định type virus, giải trình tự gen VP1 và xác

định mức tương đồng kháng nguyên bằng giá trị r1 với các vaccin được sử dụng phổ biến tại châu Á và tại Việt Nam là vaccin LMLM type O (O-3039 và O-Manisa). Nghiên cứu cho thấy có 4 virus LMLM type O đã và đang lưu hành tại Việt Nam là toptype (ME-SA) PanAsia, (ME-SA) Ind2001d, (SEA) Mya98, và Cathay; trong đó Cathay chỉ gây bệnh cho lợn và (ME-SA) Ind2001d mới xuất hiện lần đầu tiên tại Việt Nam trong năm 2015. Kết quả phân tích cây phả hệ gen VP1 của các virus LMLM type O lưu hành tại Việt Nam được giải trình tự từ năm 2008 – 2015 được trình bày tại hình 1.

- Virus chọn nghiên cứu làm giống sản xuất vaccin được thu thập từ năm 2008 – 2015 với tổng số 118 virus từ 29 tỉnh đã chọn ra 30 virus phân lập trên trâu, bò và lợn từ 18 tỉnh đại diện cho cả 3 miền Bắc, Trung và Nam để nghiên cứu về tương đồng kháng nguyên bằng giá trị r1 và các đặc điểm sinh học nhằm chọn giống virus để sản xuất vaccin.

2.3.2. Chuẩn độ virus và đánh giá sự thích nghi của virus trên tế bào BHK-21

Tế bào BHK-21 dạng một lớp (BHK-21 mono layer cell) được nuôi bằng môi trường MEM trên đĩa nhựa 96 giếng (12 cột x 8 hàng) để xác định hiệu giá virus. Virus RAHO6/FMD/O-135 được pha loãng bậc 10, từ 10^{-1} đến 10^{-10} , mỗi bậc pha loãng được lặp lại 4 lần (4 giếng), sau đó cho một lượng tế bào như nhau vào tất cả các giếng, ủ đĩa tế bào ở 37°C trong tủ ẩm có chứa 5% CO_2 trong vòng 48 giờ. Kết quả

được ghi nhận vào lúc 48 giờ ủ, giếng có bệnh tích tế bào (CPE) là giếng dương tính (+), giếng không có CPE là giếng âm tính (-). Hiệu giá virus được thể hiện bằng liều gây nhiễm 50% trên tế bào (TCID₅₀/ml) và được tính bằng công thức Kärber (1931).

2.3.3. Xác định mức tương đồng kháng nguyên giữa virus vaccin và virus thực địa (giá trị r1)

Mẫu huyết thanh thử được dùng để thực hiện phương pháp trung hoà virus (VNT) với cả virus sản xuất vaccin (RAHO6/FMD/O-135) và virus thực địa, được pha loãng bậc 2 từ 1/4 đến 1/512, mỗi độ pha loãng được thực hiện ở hai giếng trên đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng và cho virus với liều gây nhiễm 100TCID₅₀/50μl vào các giếng để trung hoà. Sau 1 giờ ủ ở 37°C , hỗn hợp huyết thanh và virus được cho thêm một lượng tế bào BHK-21 vào tất cả các giếng. Tiếp tục ủ ở 37°C trong tủ ẩm chứa 5% CO_2 và đọc kết quả lúc 48 giờ bằng kính hiển vi soi ngược dựa trên tình trạng bệnh tích tế bào (CPE) tại các giếng; giếng không có CPE là giếng có kháng thể (+) ở độ pha loãng tương ứng; giếng có CPE là giếng không có kháng thể (-) ở độ pha loãng tương ứng; hiệu giá kháng thể được tính bằng công thức Kärber (OIE, 2012). Hiệu giá kháng thể trung hoà của mẫu huyết thanh thử với 29 virus thực địa và virus vaccin được sử dụng để tính giá trị r1, xác định mức tương đồng kháng nguyên giữa virus vaccin và virus thực địa theo công thức Spearman-Kärber như sau:

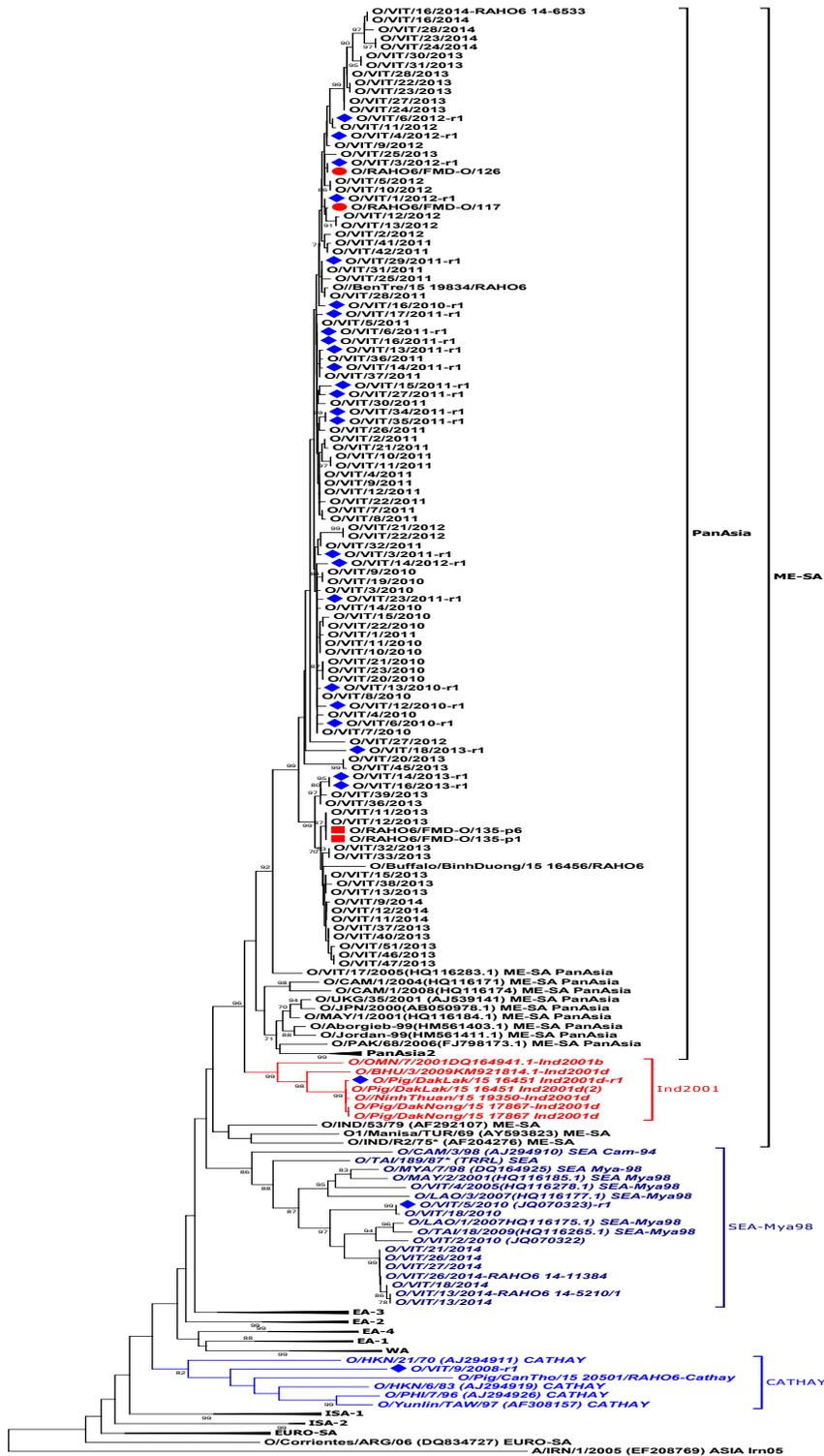
$$r1 = \frac{\text{Hiệu giá kháng thể của huyết thanh do vaccin trung hòa với virus}}{\text{Hiệu giá kháng thể của huyết thanh do vaccin trung hòa với virus vaccin}}$$

Nếu r1 có giá trị $\geq 0,3$ thì được xem là virus vaccin có tương đồng với virus thực địa

2.3.4. Thí nghiệm trên bò

Chọn 8 bò khỏe mạnh nhập khẩu từ Úc tại trại bò của công ty Kết Phát Thịnh, xã Đức Lập Thượng, huyện Đức Hòa, tỉnh Long An có trọng lượng 450-500 kg, chưa tiêm phòng vaccin LMLM.

Virus RAHO6/FMD/O-135 có hiệu giá $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml được vô hoạt bằng hóa chất BEI-FA 0.03M (Ali, 2009), cô đặc kháng nguyên bằng hợp chất có trọng lượng phân tử cao PEG 6000 (Doel, 1982) và tạo vaccin nhũ dầu đơn bằng nhũ dầu Montanide ISA-206 theo quy trình của Công ty sản xuất nhũ dầu (Công ty Seppic).



Hình 1. Cây phả hệ gene VP1 của các virus LMLM type O lưu hành tại Việt Nam được giải trình tự từ năm 2008 – 2015

Ký hiệu trước tên virus trên cây phả hệ : ■ : Virus được chọn đánh giá ♦ : Các virus chọn làm đại diện để nghiên cứu mức tương đồng kháng nguyên (r1) với virus vaccin. ● : Virus có khả năng phát triển thành giống để sản xuất vaccin; virus thuộc dòng PanAsia chiếm đa số với 87,29%, dòng Mya98 chiếm 8,47%, dòng Ind2001d chiếm 2,54% và dòng Cathay chiếm 1,69%. Trong đó dòng Ind2001d mới xuất hiện lần đầu tiên tại Việt Nam trong năm 2015. Sự khác biệt nucleotid giữa các virus trong cùng một chủng virus là <2%; sự khác biệt nucleotide giữa các virus khác dòng là <4%.

Liều vaccin là 2ml/liều và chứa 10 µg kháng nguyên 146S/ml vaccin (Doel,1990).

Bò thí nghiệm được lấy máu ngay trước khi tiêm phòng (mẫu ngày 0), và theo dõi lấy máu 14 ngày (mẫu ngày 14) và 21 ngày (mẫu ngày 21) sau tiêm phòng để xét nghiệm. Xét nghiệm định lượng kháng thể trung hòa virus LMLM type O bằng phương pháp trung hoà virus trên tế bào với virus sản xuất vaccin RAHO6/FMD/O-135 để xác định hiệu giá kháng thể trung hòa trước và sau tiêm phòng (OIE, 2015).

Ngoài ra, các mẫu huyết thanh còn được xét nghiệm phát hiện kháng thể kháng

nguyên không cấu trúc (NSP-3ABC) của virus LMLM bằng phương pháp ELISA với bộ kit PrioCHECK FMDV NS-Prionic AG, Hà Lan.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Chọn chủng virus LMLM từ thực địa

Với mục tiêu sớm chọn được virus LMLM type O để làm giống sản xuất vaccin thay thế vaccin đang sử dụng nên trong nghiên cứu này đã chọn ra 5 chủng virus có giá trị r1 cao nhất với vaccin đang sử dụng trong số 30 virus đại diện nêu trên để đánh giá bước đầu. Nguồn gốc của các virus được chọn và kết quả giá trị r1 được trình bày tại bảng 1 và bảng 2.

Bảng 1. Nguồn gốc của các virus thực địa được chọn để đánh giá chọn giống

TT	Tên chủng virus	Địa phương	Năm phân lập	Động vật	Topotype
1	RAHO6/FMD/O-117	Quảng Ninh	2012	Lợn	ME-SA
2	RAHO6/FMD/O-126	Thái Bình	2012	Lợn	ME-SA
3	VIT/16/2011	Thái Nguyên	2011	Trâu	ME-SA
4	VIT/18/2013	Phú Yên	2013	Bò	ME-SA
5	RAHO6/FMD/O-135	Quảng Nam	2013	Bò	ME-SA

Bảng 2. Giá trị r1 của 5 virus thực địa được chọn và virus vaccin

Virus type O được chọn	Giá trị r1 của các virus (1) được xác định bằng phương pháp trung hòa virus (VNT)						
	RAHO6/O-117	RAHO6/O-126	VIT/16/2011	VIT/18/2013	RAHO6/O-135	O 3039 (3)	O manisa
RAHO6/FMD/O-117 (2)	1	>1	>1	0.09	>1	0.52	0.31
RAHO6/FMD/O-126 (2)	>1	1	>1	0.02	>1	0.80	0.36
VIT/16/2011	>1	>1	1	0.03	>1	>1	0.31
VIT/18/2013	>1	>1	>1	1	>1	>1	0.52
RAHO6 /FMD/O-135 (2)	0.71	>1	0.18	0.04	1	>1	0.43

(1): Giá trị $r1 \geq 0.3$ được xem như virus vaccin có tương đồng kháng nguyên với virus thực địa, giá trị r1 càng cao thì mức tương đồng càng cao cũng đồng nghĩa là vaccin càng có khả năng bảo hộ tốt với virus thực địa; (2) Virus được mã hóa theo quy định của Cơ quan Thú y vùng VI; (3). Giá trị r1 của vaccin O-3039 và O Manisa với các virus được chọn do Phòng thí nghiệm tham chiếu về bệnh LMLM của OIE (World Reference Laboratory, Pirbright - UK) cung cấp.

Kết quả tại bảng 2 cho thấy 3 virus được chọn là virus RAHO6/FMD/O-135, RAHO6/FMD/O-126 và RAHO6/FMD/O-117 đều có giá trị $r_1 > 0,3$. Dựa vào đặc tính sinh học, di truyền và nguồn gốc của virus, chúng tôi ưu tiên chọn virus RAHO6/FMD/O-135 để nghiên cứu, đánh giá và phát triển thành giống virus để sản xuất vaccin. Virus RAHO6/FMD/O-135 đã được Cơ quan Thú y Vùng VI và Phòng thí

nghiệm tham chiếu về bệnh LMLM của OIE (World Reference Laboratory, Pirbright-UK) đồng xác định là virus LMLM type O, topotype ME-SA, PanAsia.

3.2. Chuẩn độ virus và đánh giá sự thích nghi của virus trên tế bào BHK-21

Sơ đồ và kết quả xác định hiệu giá virus được trình bày tại bảng 3.

Bảng 3. Sơ đồ và kết quả xác định hiệu giá virus LMLM type O, RAHO6/FMD/O-135

Pha loãng virus	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	Đối chứng môi trường	Đối chứng tế bào
Virus RAHO6/FMD/O-135	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: (+) có bệnh tích tế bào; (-) không có bệnh tích tế bào; mỗi giếng có 50 µl virus

Kết quả từ bảng 3 cho thấy virus RAHO6/FMD/O-135 đã phát triển tốt trên tế bào BHK-21 dạng một lớp và có hiệu giá virus đạt 10^{6.25} TCID₅₀/50µl, tương đương 10^{7.55} TCID₅₀/1ml.

Đánh giá sự thích nghi của virus RAHO6/FMD/O-135 bằng cách nuôi cấy chuyển tiếp đời, liên tục từ đời 1 đến đời 8 trên tế bào BHK-21 dạng huyền phù, lượng tế bào trong 1ml là

2,5 triệu tế bào, liều virus gây nhiễm tính theo M.O.I (Multiplicity of Infection) là 0.01. Virus phải tạo bệnh tích tế bào đạt 90% - 100% CPE trong vòng 24 giờ và được thu hoạch, bảo quản ở nhiệt độ âm sâu (-75°C đến -80°C).

Các đời virus đều được xác định hiệu giá virus và kết quả được trình bày tại bảng 4.

Bảng 4. Hiệu giá virus qua các đời nuôi cấy trên tế bào BHK-21

Số đời (Passage)	Đời 1	Đời 2	Đời 3	Đời 4	Đời 5	Đời 6	Đời 7	Đời 8
Hiệu giá virus TCID ₅₀ /1ml	10 ^{6.3}	10 ^{6.55}	10 ^{6.80}	10 ^{7.05}	10 ^{7.05}	10 ^{7.30}	10 ^{7.30}	10 ^{7.55}

Kết quả tại bảng 4 cho thấy hiệu giá virus tăng từ 10^{6.3}TCID₅₀/ml đến 10^{7.55} TCID₅₀/ml qua các đời nuôi cấy chuyển tiếp liên tục trên tế bào từ đời 1 đến đời 8. Điều này cho thấy virus RAHO6/FMD/O-135 thích nghi, phát triển tốt trên tế bào BHK-21 dạng huyền phù và đạt được hiệu giá virus cần thiết ($\geq 10^{6.5}$ TCID₅₀/ml) để sản xuất

vaccin theo tiêu chuẩn khuyến cáo của OIE.

3.3. Hiệu giá kháng thể của huyết thanh thỏ đã tiêm kháng nguyên virus vaccin RAHO6/FMD/O-135

Thỏ được tiêm kháng nguyên virus vaccin RAHO6/FMD/O-135 với liều 1ml chứa 15µg

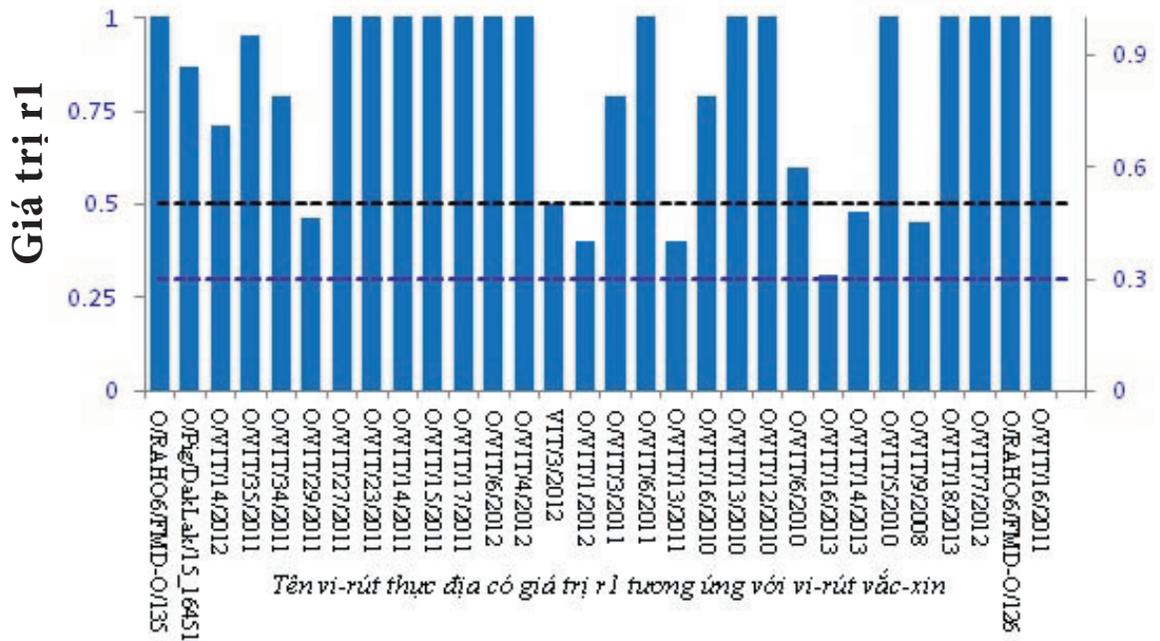
kháng nguyên 146S, sử dụng chất bổ trợ miễn dịch FCA (Freund's complete adjuvant) và lấy máu ở ngày 28 sau khi tiêm (Avis, 2002).

Huyết thanh của thỏ đã tiêm kháng nguyên virus vaccin RAHO6/FMD/O-135 được sử dụng để thực hiện phản ứng trung hòa chéo với 29 virus thực địa

phân lập được trên trâu, bò và lợn từ 18 tỉnh đại diện cho cả 3 miền (Nam - Trung - Bắc) trong khoảng thời gian từ năm 2008 - 2015. Kết quả hiệu giá kháng thể của huyết thanh thỏ được xác định bằng các phản ứng trung hòa với 29 virus thực địa và virus vaccin được trình bày tại bảng 5 và biểu đồ 1.

Bảng 5. Kết quả giá trị r1 của virus vaccin RAHO6/FMD/O-135 với 29 virus thực địa

TT	Ký hiệu chủng virus	Nguồn gốc động vật	Địa điểm phân lập (tỉnh)	Topotype	Hiệu giá kháng thể (Log10)	Giá trị r1
1	O/RAHO6/FMD-O/135	Bò	Quảng Nam	PanAsia	2.26	1
2	O/Pig/DakLak/15_16451	Lợn	Đắk Lắk	Ind2001d	2.2	0,87
3	O/VIT/14/2012	Lợn	Đồng Nai	PanAsia	2.11	0,71
4	O/VIT/35/2011	Bò	Kon Tum	PanAsia	2.24	0,95
5	O/VIT/34/2011	Bò	Kon Tum	PanAsia	2.16	0,79
6	O/VIT/29/2011	Lợn	Bến Tre	PanAsia	1.92	0,46
7	O/VIT/27/2011	Lợn	Tiền Giang	PanAsia	2.39	>1
8	O/VIT/23/2011	Lợn	Bà Rịa-Vũng Tàu	PanAsia	2.46	>1
9	O/VIT/14/2011	Lợn	Bến Tre	PanAsia	2.56	>1
10	O/VIT/15/2011	Lợn	Hà Nội	PanAsia	2.82	>1
11	O/VIT/17/2011	Lợn	Thái Nguyên	PanAsia	2.51	>1
12	O/VIT/6/2012	Lợn	Hà Nam	PanAsia	2.64	>1
13	O/VIT/4/2012	Lợn	Thái Bình	PanAsia	2.66	>1
14	O/VIT/3/2012	Lợn	Thái Bình	PanAsia	1.96	0,5
15	O/VIT/1/2012	Lợn	Quảng Ninh	PanAsia	1.86	0,4
16	O/VIT/3/2011	Lợn	Bà Rịa-Vũng Tàu	PanAsia	2.16	0,79
17	O/VIT/6/2011	Trâu	Tuyên Quang	PanAsia	2.34	>1
18	O/VIT/13/2011	Lợn	Đồng Nai	PanAsia	1.86	0,4
19	O/VIT/16/2010	Lợn	Tiền Giang	PanAsia	2.16	0,79
20	O/VIT/13/2010	Lợn	Tp. Hồ Chí Minh	PanAsia	2.64	>1
21	O/VIT/12/2010	Bò	Bà Rịa-Vũng Tàu	PanAsia	2.5	>1
22	O/VIT/6/2010	Bò	Long An	PanAsia	2.04	0,6
23	O/VIT/16/2013	Bò	Ninh Thuận	PanAsia	1.75	0,31
24	O/VIT/14/2013	Bò	Quảng Nam	PanAsia	1.94	0,48
25	O/VIT/5/2010	Lợn	Hà Tĩnh	Mya-98	2.26	1
26	O/VIT/9/2008	Lợn	Tp. Hồ Chí Minh	Cathay	1.91	0,45
27	O/VIT/18/2013	Bò	Phú Yên	PanAsia	2.34	>1
28	O/RAHO6/FMD-O/117	Lợn	Quảng Ninh	PanAsia	2.64	>1
29	O/RAHO6/FMD-O/126	Lợn	Thái Bình	PanAsia	2.5	>1
30	O/VIT/16/2011	Trâu	Thái Nguyên	PanAsia	2.34	>1



Biểu đồ 1. Kết quả giá trị r1 của virus vaccin RAHO6/FMD/O-135 với virus thực địa

Kết quả tại bảng 5 và biểu đồ 1 cho thấy virus RAHO6/FMD/O-135 có giá trị r1 >0,3 đối với tất cả 29 virus đại diện từ thực địa, trong đó có 6 virus thực địa có giá trị r1 từ 0,31 – 0,48, chiếm 20,69%; 8 virus thực địa có giá trị r1 từ 0,5 đến <1, chiếm 27,58% và 15 virus thực địa có giá trị r1 ≥1, chiếm 51,72%. Như vậy có tới 79,31%

virus thực địa có r1 ≥0,5.

3.4. Thí nghiệm trên bò

3.4.1 Xét nghiệm định lượng kháng thể trung hòa virus LMLM type O

Kết quả được trình bày tại bảng 6.

Bảng 6. Hiệu giá kháng thể trung hòa trước và sau tiêm phòng

Ký hiệu bò	Ngày 0	Ngày 14	Ngày 21
B1	0	1.36	2.56
B2	0	1.65	2.86
B3	0	1.65	2.41
B4	0	1.04	1.96
B5	0	0.9	2.86
B6	0	1.36	2.56
B7	0	1.36	2.86
B8	0	1.04	2.56

Mẫu có hiệu giá kháng thể ≥1.65 được xem là mẫu dương tính (+), có kháng thể LMLM. Mẫu có hiệu giá kháng thể từ ≥1.2 đến <1.65 được xem là mẫu nghi ngờ (±), nghi ngờ có kháng thể LMLM. Mẫu có hiệu giá kháng thể <1.2 được xem là mẫu âm tính (-), không có kháng thể LMLM.

Kết quả tại bảng 6 cho thấy : Bò thí nghiệm chưa được tiêm phòng vaccin LMLM type O trước khi tiêm vaccin thử nghiệm, vaccin vô hoạt nhũ dầu sản xuất từ kháng nguyên virus RAHO6/FMD/O-135 có hiệu quả tốt trên bò, kích thích đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể trung hoà có thể phát hiện được bằng phương pháp trung hòa virus (VNT). Lúc 14 ngày sau tiêm phòng với 2/8 bò thí nghiệm (+), chiếm

25% và 3/8 bò thí nghiệm (\pm), chiếm 37,5%. Đến ngày thứ 21 sau tiêm phòng, tất cả 100% bò được tiêm phòng đều có miễn dịch với hiệu giá kháng thể trung hoà, thấp nhất là 1.96 và cao nhất là 2.86 so với chuẩn khuyến cáo của OIE là 1.65.

3.4.2 Xét nghiệm kháng thể kháng kháng nguyên NSP- 3ABC của virus LMLM

Kết quả được trình bày tại bảng 7.

Bảng 7. Kết quả xét nghiệm kháng thể kháng kháng nguyên NSP- 3ABC của virus LMLM

Ký hiệu bò	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
Ngày 0	-	-	-	-	-	-	-	-
Ngày 14	-	-	-	-	-	-	-	-
Ngày 21	-	-	-	-	-	-	-	-

Mẫu âm tính (-): không có kháng thể kháng NSP-3ABC

Kết quả tại bảng 7 còn cho thấy, bò thí nghiệm không bị nhiễm virus LMLM trong tự nhiên trước khi tiêm phòng thử nghiệm và vaccin thử nghiệm không sinh ra kháng thể kháng kháng nguyên NSP-3ABC của virus LMLM ở bò được tiêm 1 lần vaccin sau 21 ngày.

IV. THẢO LUẬN

Kết quả nghiên cứu về lưu hành virus LMLM type O tại Việt Nam từ năm 1997 - 2015 của Cơ quan Thú y vùng VI và Phòng thí nghiệm tham chiếu về bệnh LMLM của OIE (World Reference Laboratory, Pirbright - UK) cho thấy có 4 virus đang lưu hành là toptype: PanAsia, Mya98, Cathay và Ind2001d. Kết quả nghiên cứu từ năm 2008 - 2015 còn cho thấy PanAsia chiếm đa số với 87,29%, Mya98 chiếm 8,47%, Ind2001d chiếm 2,54% và Cathay chiếm 1,69%, trong đó Ind2001d mới xuất hiện trong năm 2015. Kháng thể đặc hiệu do virus RAHO6/FMD/O-135 tạo ra trên thỏ có khả năng trung hòa chéo với 29 virus

LMLM type O được chọn đại diện từ các ổ dịch xảy ra trên trâu, bò và lợn tại 18 tỉnh thuộc cả 3 miền (Bắc, Trung và Nam) từ năm 2008-2015. Với giá trị r_1 thấp nhất là 0,31 và có đến 79,31% virus thực địa được thử nghiệm có giá trị $r_1 > 0,5$ đối với virus RAHO6/FMD/O-135. Điều này cho thấy virus RAHO6/FMD/O-135 có mức tương đồng kháng nguyên rất cao đối với các virus thực địa đang lưu hành tại Việt Nam.

Mức tương đồng cao đối với virus thực địa là một đặc điểm quan trọng, quyết định chất lượng và hiệu lực của virus được chọn làm giống để sản xuất vaccin LMLM. Trong điều kiện thử nghiệm nêu trên còn cho thấy vaccin vô hoạt, nhũ dầu được sản xuất từ virus RAHO6/FMD/O-135 có hiệu quả đáp ứng miễn dịch rất tốt trên bò, với liều vaccin được tiêm thử nghiệm là 2ml, sau 21 ngày tất cả 8 bò thử nghiệm đều có kháng thể trung hoà với hiệu giá kháng thể (\log_{10}) từ 1.96 đến 2.86 so với chuẩn khuyến cáo của OIE là 1.65.

Chúng tôi đã nghiên cứu về độ ổn định tính kháng nguyên, đặc tính sinh học, đặc tính sinh học phân tử và một số chỉ tiêu khác của virus RAHO6/FMD/O-135 đều đạt để chọn làm giống gốc (không trình bày trong báo cáo này).

Để chủ động nghiên cứu sản xuất vaccin trong nước, chúng tôi cũng đã và đang tiếp tục nghiên cứu chọn giống virus LMLM type A để sản xuất vaccin LMLM 2 type (O+A), góp phần thực hiện chủ trương của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Cục Thú y nhằm đáp ứng yêu cầu thực tiễn trong công tác phòng, chống bệnh LMLM cho gia súc trong thời gian tới.

V. KẾT LUẬN

Từ các kết quả thử nghiệm được trình bày như trên, chúng tôi nhận thấy virus RAHO6/FMD/O-135 đã có đầy đủ các đặc điểm cơ bản để chọn làm giống virus (Master seed) để nghiên cứu sản xuất vaccin với quy mô lớn phòng bệnh LMLM cho gia súc tại Việt Nam.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Cục Thú y, Cơ quan Thú y vùng VI; Các cơ quan Thú y vùng khác và các Chi cục Thú y; Công ty chăn nuôi gia súc Kết Phát Thịnh và các bạn đồng nghiệp đã tận tình giúp đỡ; xin cảm ơn Phòng thí nghiệm tham chiếu về bệnh LMLM của OIE (World Reference Laboratory, Pirbright - UK) đã cung cấp các số liệu để chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ali, S.M., Abd El-Aty, M.M., Elnakashly, S.A., and El- Kilany, A.S. 2009. "Inactivation of FMDV (Type O and A) by using a combination of binary ethylene amine and Formaldehyde". *3rd Sci. Cong*, 962-973.
2. Avis, 2002, Website: <http://aleffgroup.com/avisfmd/A010-fmd/mod2/0520-antisera.html>
3. Barteling S.J., 2012. Development and performance of inactivated vaccines against foot and mouth disease. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2012, 21 (3), 577-588.
4. Boklund A., Halasa T., Christiansen L.E., 2013. Comparing control strategies against foot-and-mouth disease: will vaccination be cost-effective in Denmark. *Prev Vet Med*, 111: 206-219.
5. Doel T. R and BaccaRin P. J., 1982. Thermal Stability of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Archives of Virology* 70, 21-32.
6. Doel T. R., Wilhams L and Barnett P.V., 1990. Emergency vaccination against foot-and-mouth disease. *Vaccine Volume* 12, 592-600.
7. OIE, 2015. Foot-and-mouth disease, Manual of Standard for Diagnostic Tests and Vaccine for Terrestrial Animals, Paris, pp:156–212.
8. Paton D.J., Valarcher J.F., Bergmann I., Matlho O.G., Palma E.L., 2005. Selection of foot and mouth disease vaccine strains - a review. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2005, 981-993.

Nhận ngày 20-7-2016

Phản biện ngày 5-8-2016